

CARACTERIZACIÓN DE DOS GENOTIPOS DE HELICONIAS PROPAGADAS *in vitro* Y ESTABILIDAD GENÉTICA DE *H. caribaea* MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES AFLP

LINA MARÍA LONDOÑO GIRALDO

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

UNIVERSIDAD DE CALDAS

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA VEGETAL

PEREIRA 2014

CARACTERIZACIÓN DE DOS GENOTIPOS DE HELICONIAS PROPAGADAS *in vitro* Y ESTABILIDAD GENÉTICA DE *H. caribaea* MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES AFLP

LINA MARÍA LONDOÑO GIRALDO

Trabajo de investigación presentado para optar al título de Magíster en Biología Vegetal

Directora

Marta Leonor Marulanda A. Ph. D.

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

UNIVERSIDAD DE CALDAS

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA VEGETAL

PEREIRA 2014

NOTA DE ACEPTACIÓN:

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Pereira, Agosto de 2014

A mi padre Jesús, el cual estuvo siempre cuidándome y guiándome. Nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, pero sé que este momento hubiera sido tan especial para tí como lo es para mí.

A mi madre Dilay, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida.

A Andres por su amor y apoyo incondicional, por compartir momentos de alegría, tristeza y demostrarme que siempre podré contar con él.

A mi familia en general, porque me han brindado su apoyo y por creer en mí.

Agradecimientos

Agradezco a mi tutora Marta Marulanda por brindarme la oportunidad de adquirir conocimiento y experiencia desde mis inicios como Bióloga y ser una de las personas que influyó en mi crecimiento académico, profesional y personal.

A Harold Suárez, mi compañero de estudios, mi amigo, mi maestro, mi hermano. Gracias por facilitarme oportunidades muy valiosas de aprendizaje, por la seguridad que depositas en mí, por el apoyo genuino e incondicional y por mostrarme nuevos caminos y prepararme para nuevas experiencias.

Agradezco de manera especial a Liliana Isaza, porque más que una compañera de trabajo, es una gran amiga y una gran mujer. Gracias por transmitir y enseñarme el mundo de las Heliconias, por la valiosa confianza depositada en mí durante estos años y por los numerosos momentos que me escuchó, apoyó y corrigió con las mejores intenciones posibles.

De la misma forma agradezco a Ana María López, por su amable disponibilidad, paciencia, motivación, por sus consejos y por sus aportes en la parte estadística durante la ejecución de esta investigación que me ayudaron a dar forma y a sacar adelante este proceso formativo.

A Lina Gómez, Paola López, Juliana Arias y demás integrantes del Laboratorio de Biotecnología Vegetal UTP, por la compañía y apoyo en este camino.

Al Doctor Joe Tohme, por brindarme la oportunidad y las facilidades de realizar una parte de esta investigación en el laboratorio de Genética Molecular en CIAT. Así mismo le agradezco a Gerardo Gallego Ph. D por su asesoría y constante atención al desenvolvimiento en parte de mi trabajo en el laboratorio y a la doctora Myriam Cristina Duque por su asesoría y los consejos destinados a la elaboración del manuscrito.

A mis profesores y a Luis G. Gutierrez, director de la Maestría, por intercambiar su conocimiento, ampliar mi mente y promover mi crecimiento académico y profesional.

Al profesor Andrés Duque por su contribución con el registro fotográfico.

A aquellas maravillosas personas que conocí y compartí durante mi estadía en CIAT, Patricia, Alexander, Mónica, Evelyn, Cesar, Conrado; gracias por su

inmensa colaboración, por la compañía y por ser artífices de una excelente experiencia.

A mis amigos y colegas de tantos años Lina, Andrea, Andrés y Juano, por sus consejos y motivaciones durante este proceso.

A mi nueva familia William Puerta (Q.E.P.D) y a Yolanda Morales, por su incondicional apoyo y preocupación por mi bienestar personal y profesional el cual siempre llevaré en mis recuerdos y en mi corazón.

A mi fiel compañía canina, Yung Ky, mi “buena suerte,” por ser el amortiguador de mis penas, el promotor de muchas alegrías y por quedarse siempre muy cerca.

Y por último a todos aquellos que directa o indirectamente enseñando, corrigiendo, animando, colaborando, acompañando, motivando, teniéndome paciencia y enfocándome hacia el futuro fueron partícipes de todo el proceso de aprendizaje.

Este trabajo de investigación fue realizado dentro del marco del proyecto: “Propagación in vitro y evaluación morfoagronómica de especies comerciales de heliconias en el centro occidente de Colombia”, Contrato: 240-200887809-3773, con vigencia: 2008 – 2011, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Gobernación de Risaralda, Universidad Tecnológica de Pereira, C.I Natura Flowers, Asociación para el desarrollo económico, sociocultural, agropecuario y ambiental - ADESACA, Carmenza Uribe de Jaramillo y María Ruth Cuervo de Naranjo y Compañía SC - Hacienda Pavas.

Y fue financiado mediante la convocatoria interna para financiar proyectos de grado de estudiantes de pregrado y postgrado del año 2011 de la Vicerrectoría de Investigaciones, Innovación y Extensión de la Universidad Tecnológica de Pereira, Código del proyecto: E2-12-2. Con vigencia: 2012.

TABLA DE CONTENIDO

LISTADO DE TABLAS	10
LISTADO DE FIGURAS	11
LISTA DE ANEXOS	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. OBJETIVO GENERAL.....	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
4. MARCO TEÓRICO	21
4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS HELICONIAS.....	21
4.1.1 Historia y Ubicación taxonómica	21
4.1.2 Distribución.....	23
4.1.3 Descripción Botánica	24
4.1.4 <i>Heliconia orthotricha</i> L. Anderss.	26
4.1.5 <i>Heliconia caribaea</i> Lam.....	26
4.2 EL CULTIVO DE LAS FLORES TROPICALES Y SU IMPORTANCIA ECONÓMICA Y COMERCIAL	27
4.3 ESTABILIDAD GENÉTICA Y VARIACIÓN SOMACLONAL.....	29
4.4 MARCADORES MOLECULARES	30
4.4.1 Marcadores moleculares basados en ADN	31
4.4.1.1 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> , AFLP)	32
5. ESTADO DEL ARTE	35
5.1 ANÁLISIS MOLECULARES EN EL ORDEN ZINGIBERALES	35
5.1.1 ANÁLISIS MOLECULARES EN LA FAMILIA HELICONIACEAE	36
5.2 ESTABILIDAD GENÉTICA Y VARIACIÓN SOMACLONAL	38
6. MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE <i>H. ORTHOTRICA</i> Y <i>H. CARIBAEA</i>	40
6.1.1 Material Vegetal.....	40
6.1.2 Extracción de ADN	41
6.1.3 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción amplificados (AFLP).	42
6.1.3.1 Selección de combinaciones	42
6.1.3.2 Digestión, ligación de adaptadores y amplificación.	43
6.1.4 Análisis de información.....	43
6.2 ESTABILIDAD GENÉTICA DE <i>H. CARIBAEA</i>	44
6.2.1 Material Vegetal.....	44
6.2.2 Extracción de ADN	45

6.2.3 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción amplificados (AFLP)	46
6.2.3.1 Selección de combinaciones	46
6.2.3.2 Digestión, ligación de adaptadores y amplificación.	46
6.2.4 Análisis de información	46
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
7.1 EXTRACCIÓN DE ADN.....	47
7.2 AMPLIFICACION DE AFLPS.....	47
7.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>H. CARIBAEA</i> Y <i>H. ORTHOTRICA</i>	51
7.4 ESTABILIDAD GENÉTICA DE <i>H. CARIBAEA</i>	56
8. CONCLUSIONES.....	63
9. RECOMENDACIONES	64
10. LITERATURA CITADA.....	65
ANEXOS	76

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Muestras y sitios de colecta del material de estudio.	41
Tabla 2. Combinaciones de AFLPs evaluadas	42
Tabla 3. Material Vegetal para la evaluación de la estabilidad genética de <i>H. caribaea</i>	45
Tabla 4. Características generales de las combinaciones de primers evaluados	48

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1. RELACIONES ENTRE LAS DIFERENTES FAMILIAS DE PLANTAS DEL ORDEN ZINGIBERALES (<i>HELICONIA SOCIETY INTERNATIONAL</i> , 2013).....	21
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE LA FAMILIA HELICONIACEAE (MOBOT, 2013).....	23
FIGURA 3. HÁBITOS FOLIARES DE LAS HELICONIAS: MUSOIDE, CANOIDE Y ZINGIBEROIDE. FUENTE: BERRY Y KRESS (1991).	25
FIGURA 4. ESPECIES DE ESTUDIO A. <i>HELICONIA ORTHOTRICA</i> ; B. <i>HELICONIA CARIBAEA</i> . FOTOGRAFÍAS POR: FERNANDO RAMÍREZ D.....	27
FIGURA 5. ESQUEMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO DE AFLP. (TOMADO DE MUELLER Y WOLFENBARGER, 1999).	34
FIGURA 6. MATERIAL DE <i>H. CARIBAEA</i> UTILIZADO PARA EL ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA. A. PLÁNTULAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO B. PLÁNTULAS EN CONDICIONES <i>IN VITRO</i>	45
FIGURA 7. SECCIÓN DE GEL DE ELECTROFORESIS DE POLIACRILAMIDA DONDE SE OBSERVAN LOS PERFILES DE ADN OBTENIDOS CON AFLPS CON LA CUARTA COMBINACIÓN DE CEBADORES (E- AAC/M-CAC) M: 1Kb <i>PLUS LADDER</i> (INVITROGEN), M2: 10 PB <i>MARKER</i>	50
FIGURA 8. DENDROGRAMA DE SIMILARIDAD SEGÚN EL ÍNDICE DE SIMILITUD DE JACCARD DE LA AGRUPACIÓN DE <i>H. ORTHOTRICA</i> Y <i>H. CARIBAEA</i> Y ALGUNOS CULTIVARES DE LAS DOS ESPECIES.	51
FIGURA 9 DENDROGRAMA DE SIMILARIDAD, BASADO EN EL ÍNDICE DE SIMILITUD DE JACCARD DE LA AGRUPACIÓN PLANTAS MICROPROPAGADAS DE <i>H. CARIBAEA</i>	56

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo de Extracción de ADN para Heliconias

ANEXO 2. Protocolo de extracción del Laboratorio de Genética Molecular CIAT (adaptado para Yuca)

ANEXO 3. Matriz de Similitud Genética para los individuos estudiados en la estabilidad genética de *H. caribaea*

ANEXO 4. Matriz de Similitud Genética para los individuos estudiados en la caracterización genética de *H. caribaea* y *H. orthotricha*

ANEXO 5. Registro Fotográfico, (Fotografías tomadas por: Andrés Duque Nivia Ph. D).

RESUMEN

Dentro de las flores tropicales, las heliconias resaltan por su diversidad en forma, color, tamaño y durabilidad particular. Estas características le dan a la familia Heliconiaceae un gran potencial en el mercado ornamental, y en este caso, la floricultura, como actividad económica en crecimiento, requiere el empleo de técnicas y estrategias que le permitan solucionar problemas para ser eficiente. Dentro de las estrategias actuales promisorias para cumplir con los requisitos de cantidad, calidad y fidelidad de las flores está el cultivo *in vitro*, sin embargo uno de sus problemas radica en la aparición de variación somaclonal y los inconvenientes relacionados a la identificación de material.

El objetivo de este trabajo consistió en caracterizar mediante marcadores moleculares AFLP genotipos de *Heliconia orthotricha* y *H. caribaea* propagadas *in vitro* y evaluar la estabilidad genética de plántulas de *H. caribaea*, para lo cual fue necesario comparar el patrón de bandeo obtenido con AFLP de las plantas evaluadas, confirmar y definir a que especie pertenecen y analizar la utilidad de los marcadores AFLP para la estimación de la similitud y estabilidad genética de plantas de heliconia.

Los resultados con los AFLPs mostraron que con el uso de 3 pares de combinaciones fue posible diferenciar los genotipos estudiados y hacer una aproximación genética a nivel de especie, la cual los agrupó con genotipos de *H. orthotricha* y *H. caribaea* respectivamente. Además es posible sugerir la presencia de variación somaclonal dentro de los clones evaluados de *H. caribaea*, la cual pudo haber estado influenciada con factores como el tipo de explante utilizado, la concentración hormonal y el número de subcultivos realizados. Sin embargo, el análisis con esta técnica no discriminó a las plantas de *H. orthotricha* y *H. caribaea* estudiadas en cultivares específicos, debido a la alta variabilidad intra e interespecífica que estos genotipos ostentan y que la técnica AFLP no es la ideal para evaluar este objetivo cuando se tiene tanta variabilidad en los individuos.

PALABRAS CLAVE

Heliconia caribaea, *Heliconia orthotricha*, caracterización genética, AFLPs, variación somaclonal, variabilidad genética

ABSTRACT

Within the tropical flowers, heliconias are remarkable for their diversity in shape, color, size and durability especially. These features give the family Heliconiaceae great potential in the ornamental market, and in this case, floriculture, as growing economic activity requires the use of techniques and strategies that allow for efficient troubleshooting. Within the current promising strategies to reach the requirements of quantity, quality and fidelity of the flowers is *in vitro* culture, but one of its problems is the appearance of somaclonal variation and disadvantages related to identification of material.

The aim of this study was to characterize with molecular markers AFLP genotypes of *Heliconia caribaea* and *H. orthotricha* propagated *in vitro* and evaluate the genetic stability of *H. caribaea* seedlings, it was necessary to compare the banding pattern obtained with the AFLP, to confirm and defining species plants and analyze the usefulness of AFLP markers for estimating genetic similarity and stability of heliconia plants.

The results showed that with using 3 pairs of combinations AFLP was possible to differentiate the genotypes studied and make a genetic approach to species level, which grouped with genotypes of *H. caribaea* and *H. orthotricha* respectively. It is also possible to suggest the presence of somaclonal variation within clones of *H. caribaea* evaluated, which may have been influenced by factors such as type of explant used, hormone concentration and the number of subcultures made. However, the analysis by this technique did not discriminate specific cultivars of *H. orthotricha* and *H. caribaea* because of the high intra -and inter- variability of these genotypes and also the AFLP technique is not ideal for evaluating this objective because when individuals have such genetic variability.

KEY WORDS

Heliconia caribaea, *Heliconia orthotricha*, genetic characterization, AFLPs, somaclonal variation, genetic stability.

1. INTRODUCCIÓN

La demanda de plantas ornamentales se ha incrementado notablemente, tanto a nivel nacional como internacional y, sin lugar a dudas, hoy en día su cultivo se ha convertido en un factor de importancia en la economía agrícola de muchos países incluido el nuestro. Dentro de estas plantas, las heliconias un grupo con 200 a 225 especies que se distribuyen en forma natural en las regiones tropicales del mundo, en especial Colombia (Castro *et al.*, 2007). Estas plantas presentan amplias posibilidades florísticas principalmente por su variedad de formas y tamaños, colorido, belleza indiscutible, así como su calidad y durabilidad sobresaliente; lo cual, hacen de ellas un renglón de amplias perspectivas en la producción de flor cortada en el mercado nacional e internacional.

Colombia ha incrementado la preferencia por iniciar este tipo de cultivos como una alternativa que puede ser muy estable a largo plazo, dado principalmente a las diversas condiciones climáticas y de hábitat en donde se pueden desarrollar diferentes tipos de heliconias durante un periodo constante de tiempo. Dentro de las especies cultivadas en el país con mayor demanda comercial a nivel internacional están las heliconias medianas y grandes como *H. stricta*, *H. wagneriana*, *H. bihai*, *H. caribaea*, con una tendencia marcada a la comercialización de cultivares de flor roja (Pinzón, 2010).

A nivel internacional se ha demostrado la importancia de utilizar técnicas biotecnológicas como la propagación *in vitro* de heliconias y considerarse como una alternativa viable para la producción a gran escala de plantas de interés paisajístico y comercial, con calidad genética y fitosanitaria (Rodrigues, 2005).

Sin embargo, a pesar del incremento en el cultivo comercial de estas plantas y la importancia económica que podrían generar, se han registrado pocos estudios especialmente a nivel nacional que incluyan técnicas biotecnológicas y moleculares para caracterizar, seleccionar, y analizar el material generado por métodos convencionales y/o cultivo *in vitro*, lo que incide de una u otra forma en una certificación parcial de la calidad de las flores requeridas por los mercados internacionales.

En el campo comercial de las flores, competir requiere necesariamente cumplir con objetivos como cantidad, calidad y fidelidad; en este sentido, el cultivo *in vitro* y estudios facilitados por marcadores moleculares pueden brindar herramientas para el fortalecimiento de la cadena productiva de Heliconias. De esta forma, y aunque los estudios relacionados con caracterización de plantas y estabilidad

genética de clones en heliconias son muy limitados, la tendencia es y deberá ser a que se encuentren articulados como un indicador de calidad y fidelidad del material a proyectos enfocados al fortalecimiento de la cadena productiva de flores y a una retroalimentación del conocimiento generado desde la academia con el conocimiento que se da en el campo.

2. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar dos genotipos de *Heliconia orthotricha* y *H. caribaea* propagadas *in vitro* y evaluar la estabilidad genética de *H. caribaea* mediante marcadores moleculares AFLP

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Utilizar marcadores moleculares AFLP para la caracterización de individuos de *Heliconia orthotricha* y *Heliconia caribaea* propagadas por cultivo *in vitro*.
2. Confirmar y definir a que especie y cultivar se relacionan las plantas de *Heliconia orthotricha* y *Heliconia caribaea* utilizando AFLPs.
3. Comparar el patrón de bandeo obtenido con AFLP de plantas micropropagadas en diferentes subcultivos y sus correspondientes plantas madres, con el fin de evaluar la estabilidad genética de *Heliconia caribaea*.
4. Analizar la utilidad de los marcadores AFLP para la estimación de la similitud y estabilidad genética de plantas de heliconia propagadas por cultivo de tejidos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de las flores tropicales, las heliconias resaltan por su diversidad en forma, color, tamaño y durabilidad particular. Estas características le dan a la familia Heliconiaceae un gran potencial en el mercado ornamental para la elaboración de arreglos y bouquets muy apreciados en el mercado europeo (Pinzón, 2010).

Colombia cuenta con una ventaja competitiva importante para la producción de flores tropicales sobre los demás países vecinos, toda vez que cuenta con un posicionamiento en el mercado mundial de flores frescas y, además, por ser el país con mayor variedad de especies de heliconias. Esto último, es una fortaleza al momento de competir, pues la diversidad del producto puede ser utilizada como factor de diferenciación (Aranda *et al.*, 2007). Se reconoce el rol que juega Colombia en las exportaciones mundiales de flores siendo uno de los principales países competidores en el grupo de proveedores de heliconias, aunque se desconocen los valores exactos de las exportaciones colombianas; se sabe que para el año 2004 eran reportados la exportación de alrededor de 24.000 a 30,000 tallos de Heliconias exportados desde Colombia, Ecuador y Costa Rica (Sosa Rodriguez, 2013).

La floricultura como actividad económica en crecimiento, requiere el empleo de técnicas y estrategias que le permitan solucionar problemas para ser eficiente. Este mercado es estimulado por la generación de nuevas variedades y formas derivadas de variedades naturales y de diferentes técnicas desarrolladas con el objetivo de generar nuevos productos. En este sentido, el cultivo de tejidos vegetales representa una importante fuente de variación, produciendo diferentes tipos de variantes somaclonales que pueden ser caracterizados como una mutación genética o epigenética (Bouman y De Klerk, 1997). A nivel fenotípico la variación somaclonal es detectada cuando el cultivo se encuentra en condiciones de vivero o campo, debido a esto, la implementación de diversos marcadores moleculares para estudiar este punto marcó un paso importante en la detección temprana y en control de las condiciones que pueden ser determinantes en cultivos de interés comercial. En este caso, en oposición a los cultivos de alimentos, la detección y caracterización de variantes somaclonales en plantas ornamentales proporciona y ofrece ventajas importantes en el mercado, haciendo a la floricultura única en este punto.

Complementario a la investigación en cultivo de tejidos y variación somaclonal, los estudios con marcadores moleculares en estas plantas pueden ser muy

interesantes, esto relacionado con que a nivel fenotípico las heliconias pueden ser muy similares vegetativamente pero su inflorescencia presenta una plasticidad en forma y color que puede ser influenciada por las condiciones de suelo, altitud, polinizadores o factores ambientales y que se convierte en una gran ventaja cuando es analizado desde el punto de vista comercial, de allí que una evaluación fenotípica puede presentar numerosos inconvenientes que podrían ser facilitados con el uso de marcadores moleculares que permitan diferenciar, agrupar y reflejen sus relaciones naturales.

Teniendo en cuenta las ventajas, algunas ya expuestas, que pueden ofrecer los marcadores moleculares, existen varias técnicas para definir y detectar polimorfismos, pero ninguna de ellas es ideal. Entre las técnicas más utilizadas en la última década están los microsatélites o SSR (simple sequence repeat), las amplificaciones al azar de ADN polimórfico ó RAPD (random amplified polymorphic DNA), el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción ó RFLP (restriction fragment length polymorphism) y el polimorfismo del largo del fragmento amplificado o AFLP (Müeller y Wolfenbarger, 1999), este último, tiene unas propiedades interesantes con respecto a su alto grado de resolución, versatilidad y reproducibilidad, así como su costo relativamente bajo, características que lo hacen idóneo en numerosos trabajos de estabilidad, variación somaclonal y caracterización genética de individuos, pudiendo ser utilizado para los dos objetivos centrales de esta investigación, más cuando el mayor número de fragmentos que esta técnica arroja podría ayudar a identificar material desconocido mediante la comparación del perfil de bandas con materiales conocidos a nivel intra e interespecífico.

A pesar del impulso comercial anteriormente mencionado y de las herramientas y técnicas que se tienen en este momento, las investigaciones sobre heliconias principalmente en el país han tenido especial interés por los inventarios y aspectos ecológicos de las especies (Berry y Kress, 1991; Devia, 1995; Henao y Ospina, 2008), con un menor interés en la publicación de estudios en cultivo *in vitro* o de biología molecular.

A nivel local, los trabajos realizados en este género por el grupo de Biodiversidad y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira han ido incursionándose en la propagación y estudios a nivel molecular con diferentes marcadores especialmente con Heliconias de interés comercial del centro occidente colombiano (Marulanda e Isaza, 2004; Isaza-Valencia, 2004; Londoño-Giraldo, 2010, Marulanda *et al.*, 2011, Marulanda *et al.*, 2011b) y en biología molecular evaluando la diversidad genética de estas plantas (Isaza – Valencia, 2008,

Marulanda *et al.*, 2011b, Isaza *et al.*, 2012). Lo anterior refleja la necesidad de realizar estudios que den una continuidad a los trabajos de investigación y hagan un abordaje de dos problemáticas relacionadas al ejercicio del cultivo *in vitro* de especies comerciales, como es la variación somaclonal y la identidad genética, la primera fundamentada en los cambios a nivel genético que pueden expresarse en una escala fenotípica muchas veces con desventajas o ventajas en el caso de las plantas ornamentales, y la segunda basada en la dificultad que existe en la diferenciación de plantas de *Heliconia* en estados juveniles y/o infértiles y a la plasticidad de la inflorescencia dada por condiciones ambientales. Lo anterior con la finalidad de incentivar y ampliar las opciones de oferta de material para cultivo y en procura de contribuir al conocimiento, conservación y calidad de nuestras heliconias.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS HELICONIAS

4.1.1 Historia y Ubicación taxonómica

La clasificación sistemática más reciente de las Heliconias según el APG III las ubica dentro del Orden Zingiberales junto a 7 familias más (MOBOT, 2013), (Figura 1).



Figura 1. Relaciones entre las diferentes familias de plantas del Orden Zingiberales (*Heliconia Society International*, 2013).

En el orden es un grupo de plantas monocotiledóneas que agrupa ocho familias, cerca de 90 géneros y 2000 especies que se distribuyen en todas las regiones tropicales del mundo. Las ocho familias han sido identificadas por caracteres y descriptores morfológicos fácilmente reconocibles, y son Musaceae (plátanos y banano), Zingiberaceae (cardamomo, ginger, jengibre), Costaceae (caña agria), Marantaceae (bihao), Cannaceae (achira), Strelitziaceae (ave del paraíso), Lowiaceae (Orchindantha) y Heliconiaceae (heliconias) (*Heliconia Society Internacional*, 2013). Estas familias se reconocen por presentar hojas con venación pinnado paralela, ovario ínfero, polen inaperturado (excepto Costaceae)

y reducción en el número de estambre funcionales, los cuales se han modificado en estaminodios (Judd *et al.*, 2002).

Actualmente la familia Heliconiaceae posee un único género (*Heliconia*) teniendo como especie tipo *Heliconia bihai* (L), y su clasificación taxonómica es:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Commelinidae

Orden: Zingiberales

Familia: Heliconiaceae

Género: *Heliconia* L.

Anderson (1985) propuso una clasificación con cuatro subgéneros y 19 secciones. En la actualidad las heliconias pueden ser subdivididas en cinco subgéneros: Subgénero *Heliconiopsis*: contiene todas las especies asiáticas, las cuales tienen espatas verdes y frutos rojos o naranja brillante.

Subgénero *Griggsia*: contiene todas las especies americanas con inflorescencia péndula.

Subgénero *Taeniostrobis*: contiene las especies con pseudotallos cortos e inflorescencias erectas y con espatas visiblemente superpuestas.

Subgénero *Heliconia*: contiene las especies con pseudotallos más largos e inflorescencias erectas y con espatas no muy imbricadas.

Subgénero *Stenochlamys*: contiene las especies con inflorescencia erecta y flores resupinadas (dirigidas hacia abajo) (Kress, 1990; Andersson, 1992).

El número de especies existentes del género es motivo de controversia entre diferentes autores, han sido propuestos alrededor de 450 nombres para especies, variedades e híbridos (Berry y Kress, 1991). Así mismo más de 200 cultivares son utilizados en el campo comercial y en la literatura popular. Los datos más recientes afirman que la Familia posee alrededor de 220 especies concentradas en el trópico americano y en el Pacífico sur (Betancur y Kress, 2007).

4.1.2 Distribución

El género está distribuido especialmente en las regiones tropicales de América, con especies que van desde el sur de México y las islas del Caribe hasta el norte de Argentina, con apenas un pequeño grupo paleotropical de seis especies (subgénero *Heliconiopsis*) de las islas del Pacífico Sur del continente Asiático (Kress, 1990; Berry y Kress, 1991) (Figura 2). El centro de diversidad del género abarca desde la región de los Andes hasta el sur de América Central (Andersson, 1981).



Figura 2. Distribución mundial de la familia Heliconiaceae (MOBOT, 2013).

Las heliconias crecen en una gran variedad de ambientes, pero la mayoría se encuentran en ambientes húmedos y lluviosos. Normalmente las especies se encuentran en ambientes perturbados y bien iluminados, como áreas abiertas a lo largo de caminos y claros. La mayoría de estas plantas se encuentran entre los 800 a 1500 m.s.n.m, con una mayor diversidad de especies especialmente sobre las vertientes pacífica y amazónica de la cadena montañosa andina, sin embargo también pueden encontrarse en altitudes menores a 500 m.s.n.m y por encima de los 2000 m.s.n.m (Kress, 1990; Kress *et al.*, 1999).

El mayor número de especies descritas se registra para Colombia con 94, seguido por Ecuador con 60, Panamá con 56, Costa Rica con 47, Brasil con 37, Perú con 32, Venezuela con 26, Nicaragua con 22, Guatemala con 16, Bolivia con 15, Honduras e México con 14 y Surinam con 13 (Castro *et al.*, 2007).

Colombia posee aproximadamente 52 especies endémicas, por lo que es el país del mundo con mayor riqueza en estas plantas. La mayor parte de las especies está en la región Andina (75%) y Pacífica (40%) (Betancur y Kress, 2007).

Los estudios en patrones de distribución global del género son escasos, Kress y Specht (2006) desarrollaron una hipótesis para la evolución espacial y temporal del orden zingiberales basados en caracteres morfológicos y moleculares y utilizando el análisis DIVA combinado con la técnica de reloj molecular. En el cual proponen que la vicarianza de Gondwana combinada con la distribución potencial en Laurasia y eventos de dispersión múltiple secundarios dentro de las familias durante el terciario pueden explicar los principales eventos biogeográficos que permitieron la distribución pantropical de este orden. También se propuso que las Zingiberales se originaron hace 124 millones de años atrás y su diversificación ocurrió cerca de 110 millones de años durante el periodo Cretácico. La familia Heliconiaceae divergió de su linaje ancestral hace 109 millones de años junto con las familias Strelitziaceae y Lowiaceae, lo que indica una rápida diversificación del linaje principal, pero el proceso de especiación de las Heliconias es más reciente y viene dándose desde los últimos 32 millones de años (Kress y Specht, 2006).

4.1.3 Descripción Botánica

Las especies de *Heliconia* son hierbas erectas, medianas o de gran tamaño (hasta 12-15m de altura), generalmente cespitosas, como producto de la presencia de rizomas con crecimiento simpodial. El número de vástagos producidos por los rizomas (tallos subterráneos) puede variar y capacita a cada especie para la colonización vegetativa del sitio donde crece. Cada vástago es erecto y está compuesto por un pseudotallo, hojas y generalmente termina en una inflorescencia. El pseudotallo está construido por las bases envainadoras y superpuestas de las hojas; su tamaño, color y textura varían entre las especies. (Betancur, 2005). Las hojas se organizan dísticamente, pero de acuerdo a su disposición espacial y a la longitud de sus pecíolos, las plantas pueden adquirir fisonomías diferentes: con hábito de *Musa*, de *Zingiber*, y de *Canna* (Figura 3). La lámina foliar en la mayoría de las especies es oblongo-elíptica, coriácea, glabra sobre ambas superficies y generalmente de color verde, aunque en algunas especies puede ser de color rojizo sobre la superficie abaxial, con un nervio central canaliculado, desde el cual salen venas laterales paralelas entre sí, en forma perpendicular u oblicua. (Betancur, 2005).

La inflorescencia está unida al pseudotallo a través de un pedúnculo, el cual se mide desde la vaina foliar terminal hasta donde empieza la primera bráctea de la inflorescencia; puede variar en tamaño, color, textura e indumento. Las inflorescencias casi siempre salen de vástagos foliosos erectos, pero ocasionalmente se pueden originar desde vástagos basales no foliosos. De acuerdo a la forma como se orienten las inflorescencias con relación al vástago que las origina, pueden ser erectas o péndulas (Betancur, 2005).

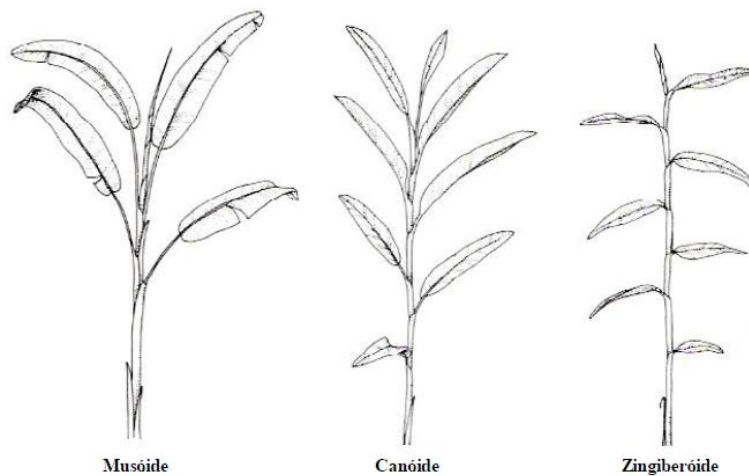


Figura 3. Hábitos foliares de las Heliconias: Musoide, Canoide y Zingiberóide. Fuente: Berry y Kress (1991).

Las flores son perfectas, zigomórfas, trímeras, hermafroditas y pentacíclicas; los sépalos pueden ser glabros o pubescentes y toman características diferentes durante la antesis, permitiendo que los polinizadores naturales, principalmente el pico de colibríes entren al tubo floral (Betancur, 2005). Todas las partes de la inflorescencia pueden ser glabras, pubérulas, hirsutas, velutinas, lanosas o cincinales; además puede ser erecto, flexuoso o entorcharse (Kress, 1990).

Una de las características distintivas del género *Heliconia* es la simetría invertida de la flor, cuando se compara con los otros géneros de las Zingiberales (Cronquist, 1981). Todas las especies tienen cinco estambres fértiles adnados a la base de los pétalos, el sexto estambre se sustituye por un estaminoide estéril que funciona en algunas especies como polinizadores guía conductor a nectarios florales, situado en el estilete (Berry y Kress, 1991). El ovario es inferior y con un solo óvulo por lóculo basifijo (Cronquist, 1981).

En el trópico americano los colibríes son los polinizadores exclusivos de las Heliconias. Por el contrario, los murciélagos que se alimentan de néctar son los polinizadores principales de las flores de las especies del trópico asiático (Berry y Kress, 1991). La mayoría de las especies de *Heliconia* son autoincompatibles, así que para que las semillas se formen es necesaria la transferencia entre muestras de polen. La fertilización entre especies es generalmente un fracaso debido a que el polen de una especie es generalmente inhibida por el de las otras especies. Sin embargo, se han descrito algunos híbridos naturales. El fruto es una drupa, las

semillas pueden ser de una a tres por fruto. La capa exterior es carnosa, y en la madurez es azul. Los frutos coloridos son muy atractivos para las aves y los mamíferos que dispersan estas semillas (Berry y Kress, 1991).

Las semillas son de diferentes formas y tamaños entre las especies. El embrión es recto, basal y rodeado por abundante endospermo. Sin embargo, las heliconias se pueden propagar no sólo por sus semillas, sino también por su rizoma (Jerez, 2007). En cuanto a los estudios de conteo cromosómico de heliconia (Andersson 1984), encontró un número diploide de $2n = 24$ y ninguna variación en la morfología del cromosoma.

4.1.4 *Heliconia orthotricha* L. Anderss.

Es una planta de hábito musoide que puede tener entre 2 a 3.5 m de altura. Posee inflorescencias erectas, planas y grandes, de hasta 45 cm de largo. La inflorescencia puede tener un raquis recto a débilmente flexuoso, amarillo a rojo y glabro a hirsuto; tiene entre 5-10 brácteas que se encuentran en posición dística, sobrelapadas y de coloraciones rojas a rosadas, algunas veces amarillas hacia la base y la quilla, los márgenes son generalmente verde oscuro algunas veces con negro o púrpura y sus flores que pueden ser parabólicas o sigmoides son blancas a crema hacia la base y verdes hacia el ápice. (Kress *et al.*, 1999).

Esta especie en condiciones naturales se encuentra entre los 800 y 1600 msnm, distribuida predominantemente en la vertiente oriental andina y en la planicie amazónica. A nivel comercial es muy cultivada y todas sus variedades (aproximadamente 14) son comerciales, algunas glabras y otras pubescentes. (Figura 4a) (Berry y Kress, 1991). Se destacan por su alta comercialización las cultivariedades Arco iris, Filo de la noche, Tricolor, Pintoresca, She, Roja, etc.

4.1.5 *Heliconia caribaea* Lam.

Es una planta (Figura 4b) de hábito musoide que puede tener entre 2.5 a 5m de altura, rústica y agresiva en su desarrollo. Hojas glabras y con el peciolo de al menos 60cm y probablemente mucho más largo y por lo general con una capa de cera prominente. Posee inflorescencias erectas y entre 6-14 brácteas recogidas, dísticas de hasta 30 cm de largo, con un raquis casi recto y coloraciones entre rojo profundo o amarillento, o amarillento difuso teñido de rojo. *H. caribaea* crece en hábitats muy sombreadas tales como cañadas boscosas y también en sitios abiertos como las orillas de los ríos y plantaciones de banano, con un rango entre 600 a 750 m.s.n.m (Andersson, 1981). Existen aproximadamente 15 variedades comerciales, caracterizadas todas por una similar inflorescencia compacta con las espátas sobrelapadas entre sí, entre las más populares están: Purpúrea, Príncipe

de la Oscuridad, Scarlata, Barbados, Vulcano, Gold, Brazilian bomber, Salmón, Yellow y Chartreuse. Algunas características florales indican una relación muy cercana con *H. bihai*.

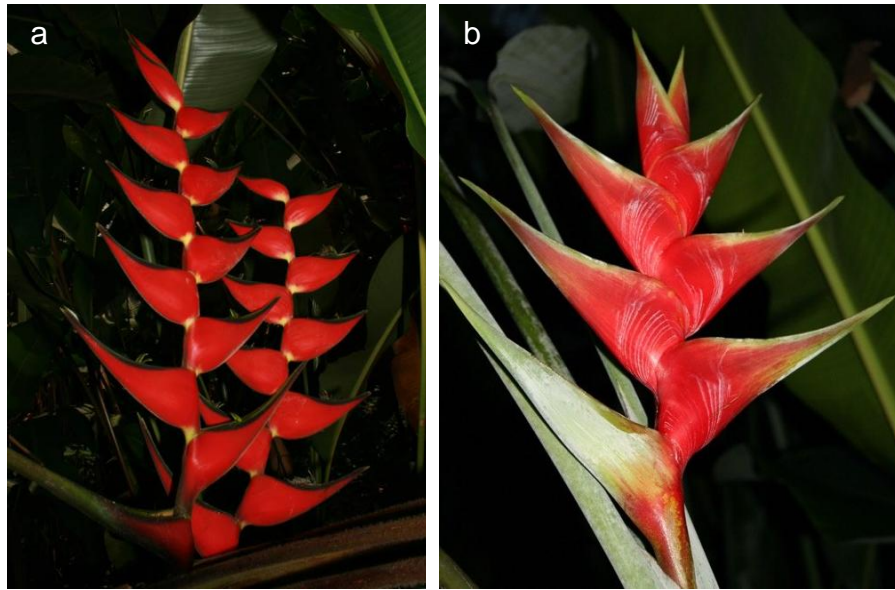


Figura 4. Especies de estudio **a.** *Heliconia orthotricha*; **b.** *Heliconia caribaea*.
Fotografías por: Fernando Ramírez D.

4.2 EL CULTIVO DE LAS FLORES TROPICALES Y SU IMPORTANCIA ECONÓMICA Y COMERCIAL

Las rosas, claveles y crisantemos dominan la demanda mundial de flores, representando cerca del 70% del mercado. En el 30% restante las flores exóticas tropicales ha empezado a ganar terreno en cuanto a demanda y clasificación en el mercado, en especial en el mercado europeo (Díaz *et al.*, 2002), y en este sentido, la producción de flores posee un enorme potencial para Colombia en vista de diversos factores como la biodiversidad del país, la variedad de climas y suelos que posibilitan el cultivo de varias especies con las especificidades que el mercado requiere.

Colombia ocupa el segundo lugar como exportador mundial por la calidad de sus flores, sus exportaciones son del 14% después de Holanda, país que exporta el 50% (Loges *et al.*, 2005). Dentro de estas, las flores tropicales presentan algunas ventajas como su aspecto exótico, belleza, mayor durabilidad postcosecha y buena aceptación en el mercado. Como flor tropical, las Heliconias están

presentando una creciente comercialización en el mercado internacional debido principalmente a una mayor oferta del producto y una mayor divulgación.

Muchas variedades de heliconias han sido comercializadas como flor de corte durante los últimos 20 años. Entre ellas se encuentran *H. wagneriana*, *H. bihai*, *H. stricta*, *H. orthotricha*, *H. caribaea*, *H. psittacorum*, *H. rostrata*; *H. chartacea*, *H. platystachys*. Otras especies cultivadas conjuntamente, son platanillos de otras familias, tales como: *Musa coccinia*, *Alpinia purpurata*, *Zingiber spectabilis*, *Etlingera elatior*, *Tapeinochilos ananassae*, *Calathea crotalifera*, *Calathea lutea*. Pero sin duda, las que encontramos más familiarizadas con la mente de los actores de la cadena, son las *H. psittacorum* y *H. caribaea* (Díaz *et al.*, 2002).

Los principales compradores de especies tropicales son Estados Unidos con una marcada compra proveniente de los sectores hoteleros, quienes compran semanalmente arreglos de flores tropicales que oscilan entre los US \$150 y los US \$ 1000, dependiendo del tamaño y la sencillez. Sin embargo, más del 80% de floristerías estadounidenses no compran flores tropicales colombianas principalmente por sus altos costos en fletes, comprando productos costarricenses (Sosa - Rodríguez, 2013).

Con respecto a este punto, observaciones realizadas por la Organización de las Naciones Unidas (2006) en el diagnóstico de la cadena de heliconias y follajes en el Eje Cafetero y Valle del Cauca sobre las condiciones tecnológicas de la producción de flores y follajes han permitido advertir entre otros, las debilidades en la consolidación de éste cultivo: en la gran mayoría de las plantaciones, los cultivos no responden a las necesidades del mercado y no se tiene en cuenta la certificación de semilla, aspecto fundamental para los mercados internacionales si se piensa en la certificación. Este último punto permite la trazabilidad de la flor desde su producción hasta el consumidor final.

Para que las heliconias tengan oportunidad en el mercado externo se deben hacer proyectos de difusión de las heliconias para que sean reconocidas en el mercado objetivo. Adicionalmente, se deben buscar subsidios para el desplazamiento de la flor desde Colombia hacia el país de destino con el fin de disminuir los costos de fletes. Internamente hay que fomentar el cultivo de ciertas variedades de heliconias dependiendo del nicho o mercado a donde se quiera llegar, en esta parte la amplia diversidad de este género en Colombia, permite así mismo, que el mercado se enriquezca continuamente con nuevos y vistosos materiales los cuales pertenecen a la biodiversidad nacional del género, la muy loable propuesta de caracterizar estos materiales persigue tácitamente entonces el objetivo de

preservar nuestros materiales en procura de asegurar la diversidad que en un futuro podría ofrecerse para enriquecer el mercado (En Colombia, 2013).

Por otro lado la identificación de especies y cultivares está basada principalmente en las características morfológicas y en la coloración de las flores e inflorescencias, sin embargo, las variaciones naturales en los individuos de las poblaciones están causando mucha divergencia entre los coleccionistas, productores y mejoradores (Berry y Kress, 1991). Ante este hecho, los nombres incorrectos de las especies que han sido cultivadas y el desconocimiento de sinónimos pueden causar problemas tanto comerciales como a nivel técnico-científico. Debido a que las condiciones de cultivo varían según la especie, el mal uso de nomenclatura puede contribuir a la dispersión de las identificaciones inexactas, lo que perpetúa los errores (Castro *et al.*, 2007).

4.3 ESTABILIDAD GENÉTICA Y VARIACIÓN SOMACLONAL

Aunque la propagación *in vitro* tiene muchas ventajas como la mayor disponibilidad de material libre de patógenos y enfermedades, mantener material vegetal en un espacio pequeño, un problema asociado al cultivo *in vitro* es la ocurrencia de variación genética resultante de la micropropagación, en este caso variación somaclonal de subclones de una línea parental (Larkin y Scowcroft, 1981). Esta es definida como la variación genética que a veces es observada en plantas regeneradas a través de células somáticas comparado con la planta usada como fuente de material (Cullis, 2007). La variación somaclonal representa una fuente de variabilidad genética en cultivares agronómicamente importante; además, resulta muy útil para incorporar nuevas características a una variedad o para modificar las que ésta tiene (Evans y Sharp, 1986), es por esto que en plantas ornamentales, este fenómeno es ampliamente utilizado como una herramienta para generar variabilidad, lo cual generaría nuevas variedades de potencial interés comercial (Sahijram *et al.*, 2003).

La variación somaclonal se puede detectar a nivel fenotípico, citológico, bioquímico y molecular en muchas plantas, a nivel molecular, la variación somaclonal es explicada como que dentro del genoma hay ciertas porciones que tienen una susceptibilidad especial a condiciones de estrés, causando altas tasas de mutación y reordenamiento comparadas con el resto del genoma (Cullis, 2007).

Para ser detectada en el ADN se han utilizado herramientas moleculares, marcadores como los RAPD (*Random Amplified Polymorphic*), ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) han sido utilizados (Gupta y Varshney, 1999) y AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (Linacero *et al.*, 2000; Labra *et al.*,

2001), los cuales han demostrado ser útiles en la comparación de ADN para la diferenciación por medio de la detección e identificación de polimorfismos, pero estos no establecen correlaciones entre la variación del ADN y variaciones fenotípicas.

Se ha reportado que la estabilidad genética de clones propagados por cultivo *in vitro* depende del genotipo (Smith, 1988), de la naturaleza del explante utilizado (Vuylsteke *et al.*, 1991), de las condiciones y el mantenimiento del cultivo (Haisel *et al.*, 2001) y del número de subcultivos realizados (Chaterjee y Prakash, 1996).

La variación somaclonal en plantas propagadas por yema vegetativa parece ser común en *Musa* (Smith, 1988; Vuylsteke *et al.*, 1991). Factores intrínsecos y del cultivo como la constitución genómica de las especies y de los cultivares, tipo de explante inicial, la composición del medio de cultivo y la duración del tiempo de propagación alteran el mantenimiento de la fidelidad genética en clones producidos por cultivo de tejidos (Sahijram *et al.*, 2003), pero de acuerdo con Larkin and Scowcroft (1981), las causas de esta variación no son muy claras y pueden diferir en cada planta.

De todos los métodos para la propagación de bananos, plátanos y afines el cultivo de meristemos de yemas apicales es el más usado y también es considerado como el más recomendable para garantizar la estabilidad genética de plantas obtenidas (Mante y Tepper, 1983).

4.4 MARCADORES MOLECULARES

Los estudios de diversidad genética han logrado un gran avance durante los últimos años con la incorporación de nuevas herramientas de análisis basadas en marcadores moleculares, obtenidos a partir de proteínas o ADN, complementando de esta forma a las clásicas estrategias de evaluación fundamentadas en caracteres morfológicos y fisiológicos.

Una gran variedad de técnicas y marcadores genéticos han sido desarrollados para evaluar la diversidad genética, sin embargo, no existe una técnica única e ideal, cada una representa ventajas y defectos. Por esto, la elección de una determinada técnica depende de la pregunta que se desee responder en la investigación y de la resolución genética necesitada (Mueller y Wolfenbarger, 1999).

Un marcador ideal debe cumplir algunas de las siguientes propiedades, y aunque no necesariamente las debe cumplir todas, se debe tener en cuenta, de acuerdo al tipo de estudio, de escoger el sistema de marcadores más adecuado y que reúna algunas de estas propiedades (Weising *et al.*, 1995):

- Ser altamente polimórficos.
- Presentar herencia codominante, la cual permite discriminar entre individuos homocigotos de heterocigotos.
- Tener una distribución homogénea en el genoma.
- Ser selectivamente neutros.
- Obtenerse en ensayos rápidos y fáciles.
- Ser altamente reproducibles.

4.4.1 Marcadores moleculares basados en ADN

La detección de cambios en la secuencia nucleotídica del ADN y su posterior explotación como marcadores genéticos implicaron grandes avances en la genética de plantas y en el mejoramiento genético. Su principal ventaja frente a las proteínas es que éstos reflejan polimorfismos únicos que no pueden ser enmascarados por la naturaleza redundante del código genético, en donde diferentes sustituciones de base dan como resultado la síntesis de un mismo aminoácido, y a su vez, la sustitución de aminoácidos no necesariamente implica cambios significativos en la estructura y carga eléctrica de la molécula. Así mismo, estas técnicas permiten la obtención de un número virtualmente ilimitado de marcadores con amplia cobertura genómica (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La visualización de los polimorfismos o perfiles del ADN puede ser lograda con técnicas basadas en la amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) o, en técnicas fundamentadas en hibridación. Una amplia variedad de modificaciones en la técnica de ambas estrategias han sido introducidas para generar tales patrones (Weising *et al.*, 1995). Los marcadores moleculares dan una estimación de la diversidad genética neutral, y los distintos tipos de técnicas ofrecen distintos tipos de información según las características de la molécula o fragmento de molécula analizado; se calculan diversos parámetros que nos dan la medida de diversidad neutral y permiten comparar entre especies y/o estudios, o también es posible establecer

relaciones de paternidad y parentesco, relaciones filogenéticas, o analizar qué procesos están ocurriendo en las poblaciones (migración, deriva genética, cuellos de botella, etc.) (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La selección de un método molecular depende de la aplicación específica que se desea. Si el objetivo es identificar el genoma o evaluar la diversidad genética, los métodos que producen un elevado número de bandas, como los AFLP's, son los apropiados, debido a que pueden ser detectados muchos loci distribuidos al azar en el genoma. Por otro lado marcadores moleculares de gran uso como los microsatélites SSR's también tienen muchas características que los hacen idóneos ser utilizados para la identificación varietal y en programas de mejora.

4.4.1.1 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP*)

Consiste en la amplificación de múltiples regiones arbitrarias del genoma (Vos *et al.*, 1995). Se basa en la amplificación arbitraria de los fragmentos de restricción del ADN ligados a adaptadores, utiliza cebadores semi-específicos con secuencia complementaria al adaptador en el extremo 5'.

Involucra cuatro etapas: digestión del ADN con dos enzimas de restricción, una de corte raro (reconoce secuencias de 6 pb) y otra de corte frecuente (reconoce secuencias de 4 pb); ligación de adaptadores específicos de doble cadena a los extremos de los fragmentos de restricción; amplificación selectiva de fragmentos con cebadores específicos y separación de los fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida (Fig. 5).

Se pueden utilizar varios métodos para revelar el patrón de bandas como el empleo de isótopos radiactivos y la tinción con nitrato de plata. Mediante la selección del número de nucleótidos selectivos es posible controlar el número de fragmentos a amplificar, siendo una relación inversamente proporcional. El polimorfismo es detectado por la presencia o ausencia de bandas debido a diferencias en los sitios de restricción, mutaciones alrededor del sitio de restricción los cuales se complementan o se diferencian de los nucleótidos selectivos añadidos a los cebadores del PCR y por inserciones o deleciones dentro del sitio de restricción amplificado (Meudt y Clarke, 2007).

Tiene las ventajas de que se obtiene un alto grado de polimorfismo, un mayor número de marcadores por gel analizado y no requiere el conocimiento de la secuencia del ADN. Debido a la cantidad de marcadores que pueden ser

generados, el mapeo genético puede realizarse más rápido y más fácilmente. Comparado con el RFLP, el AFLP es más rápido, menos laborioso y provee mayor información. Tiene la ventaja sobre el RAPD en su repetibilidad. El AFLP revela fundamentalmente el polimorfismo dominante que puede ser por la presencia o ausencia del sitio de restricción o por una simple variación de un nucleótido entre genomas aunque también puede ser usado como marcador codominante (Meudt y Clarke, 2007).

El método de AFLP es una técnica poderosa para la detección y evaluación de la variación genética en colecciones de germoplasma y el estudio de la biodiversidad y ha sido una herramienta útil para múltiples aplicaciones en las que se desconoce la secuencia nucleotídica, tales como el mapeo de la variabilidad genética (Vos *et al.*, 1995, Vuylsteke *et al.*, 2007), migración de especies y análisis filo o biogeográficos. Así mismo los AFLP presentan un alto poder de detección de variabilidad genética debido a que exploran simultáneamente la presencia o ausencia de sitios de restricción, como en los RFLPs, y la ocurrencia o no ocurrencia de amplificación, como en los RAPD (Sánchez-Chiang y Jimenez, 2009). La técnica de AFLP puede ser la más indicada en distintas situaciones (Meudt y Clarke, 2007):

- Cuando no existe información *a priori* de la secuencia.
- Para estudios a nivel intra-específico.
- Cuando la variabilidad genética es baja.
- Para la rápida generación de datos.
- Cuando se dispone de alta calidad de ADN.
- Cuando no se han establecido marcadores adecuados.

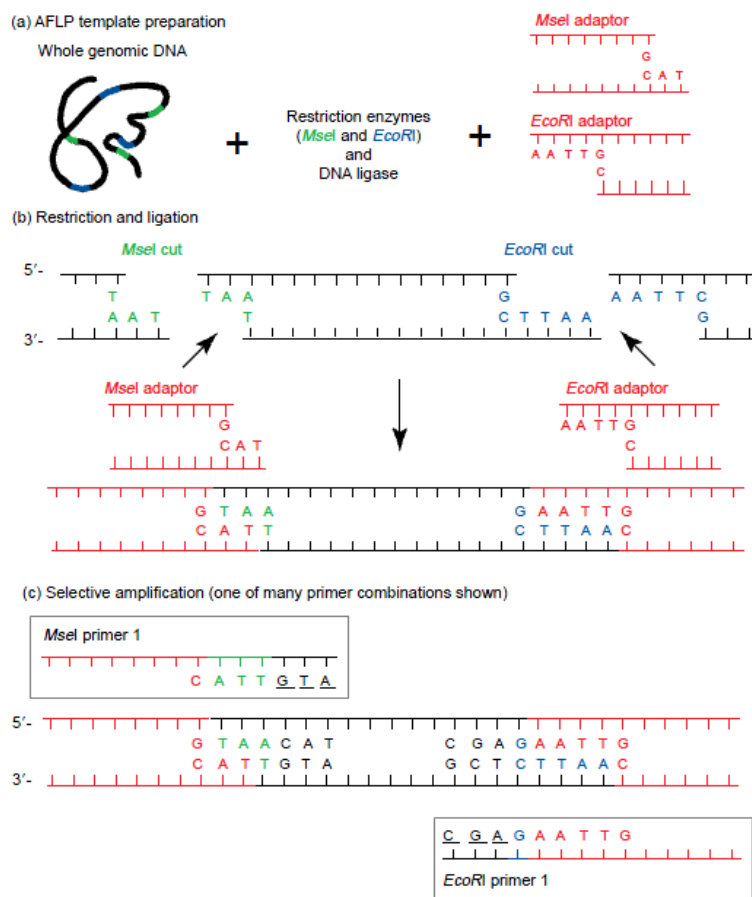


Figura 5. Esquema general del procedimiento de AFLP. (Tomado de Mueller y Wolfenbarger, 1999).

Adicionalmente estudios en los últimos años han demostrado la utilidad de los AFLPs para generar huellas de ADN y diferenciar individuos estrechamente relacionados a nivel de subespecie y ecotipos. Esto demuestra que los AFLP son una técnica muy sensible y reproducible que puede ser utilizada para la detección de alteraciones genómicas específicas como es el caso de detección de variación somaclonal en plantas generadas por cultivo *in vitro* (Bairu *et al.*, 2011).

5. ESTADO DEL ARTE

5.1 Análisis moleculares en el Orden Zingiberales

La familia Zingiberales ha sido motivo de varios estudios utilizando marcadores moleculares, para numerosos objetivos ya sea diversidad genética, filogenia molecular, caracterización genética, es posible destacar entre varios trabajos a Kress *et al.*, (2002) que con datos moleculares realizaron un estudio filogenético y una nueva clasificación de Gingers (Zingiberaceae), basados en ITS nuclear y en las secuencias de cloroplasto de la región *matk*, sugiriendo que las tribus son parafiléticas. Wahyuni *et al.*, (2003) analizaron las relaciones genéticas existentes de 28 accesiones de Gingers (*Zingiber officinale*) procedentes de África, Japón e Indonesia utilizando marcadores AFLP, los resultados separan a estas plantas en más de los 3 grupos en los que son diferenciados naturalmente (Ginger Roja, Ginger Grande y Ginger Enana). Williams *et al.*, (2004) estudiaron la filogenia, evolución y clasificación del género *Globba* y la tribu *Globbeae* (Zingiberaceae), utilizando secuencias de ADN nuclear y de cloroplastos. Kress *et al.*, (2005), realizaron un estudio del género *Alpinia* de la familia Zingiberaceae, los autores utilizaron secuencias de ADN y de cloroplasto para evaluar su origen monofilético. Jatoi *et al.*, (2006), analizaron la diversidad genética utilizando marcadores microsatélites diseñados para la familia y otros diseñados para genotipos de arroz en 14 genotipos de 3 géneros (*Zingiber*, *Alpinia* y *Curcuma*) de la familia Zingiberaceae con amplificaciones para los dos tipos de SSR y un polimorfismo mayor a 99%, lo cual permite mayores estudios sobre la transferibilidad de los SSR de una especie para el estudio de otras especies de la misma familia botánica o familias filogenéticamente cercanas y, Prem *et al.*, (2008) caracterizaron molecularmente genotipos de Ginger exóticas, élite y primitivas utilizando marcadores RAPD e ISSR con el fin de proteger el pool genético. Los resultados relacionan fuertemente a las Ginger de genotipos modernos élite, con genotipos silvestres y primitivos.

Sin embargo, el género *Musa* por su popular uso alimenticio es objeto de investigación y se destaca con una mayor cantidad de trabajos a nivel mundial, algunos de estos incluyen a Ude *et al.*, (2003) que utilizaron marcadores AFLP para evaluar la diversidad genética y las relaciones entre 28 accesiones de *Musa acuminata* (AA) y *Musa balbisiana* (BB) y las relaciones con algunos híbridos naturales utilizando AFLP; los análisis de Similitud y Coordenadas Principales produjeron dos agrupaciones que correspondieron con la composición genómica de las accesiones (AA, BB, AAB y ABB). Estos datos con AFLP sugieren la existencia de nuevas relaciones a nivel de sub-especies en el complejo grupo de

las *M. acuminata*. Peteira *et al.*, (2003) estudiaron la variabilidad genética de algunas especies de *Musa* mediante marcadores moleculares RAPD dirigido a 20 accesiones del banco cubano de germoplasma de bananos y plátanos, entre los cuales se encontraban materiales autóctonos, accesiones de amplia difusión mundial, tres clones promisorios obtenidos por mutagénesis y una variante somaclonal. Los resultados arrojaron agrupamientos que corresponden con las relaciones de parentesco existentes entre las introducciones estudiadas, así como con las características fenotípicas analizadas. Noyer *et al.*, (2005) utilizaron marcadores SSR y AFLP para caracterizar la diversidad genética de 30 genotipos de plátanos. Los resultados confirmaron la hipótesis de una muy estrecha base genética de estos cultivares y se confirmó que todos los materiales provienen probablemente de la multiplicación de una yema proveniente de una planta inicial. Nadal-Medina *et al.*, (2009) caracterizaron genéticamente a 17 cultivares pertenecientes a cuatro subgrupos genómicos (“Cavendish”, “Red”, “Plantain”, “Ibota” y “Silk”) y cinco híbridos de bananos y plátanos mediante los marcadores RAPD. Se registró una estrecha relación entre la clasificación morfológica y diversidad molecular detectada entre los subgrupos analizados.

5.1.1 Análisis moleculares en la Familia Heliconiaceae

En las Heliconias, se han realizado numerosos estudios en diversidad, filogenia y caracterización genética; algunos de los estudios sobresalientes de la aplicación de marcadores moleculares son: Kumar *et al.*, (1998) desarrollaron un protocolo para la extracción de ADN de hojas de heliconia y analizaron variaciones y similitudes genéticas entre especies cultivares e híbridos con marcadores moleculares RAPD. Los resultados evidenciaron el origen monofilético del grupo, y la agrupación de 2 cultivares de *H. psittacorum* asociados a un mismo genotipo, así mismo, utilizando los mismos marcadores RAPD; Matos *et al.*, (2004) estudiaron la variabilidad genética en dos poblaciones de heliconias obtenidas a través de cultivo de embriones de plantas de *H. bihai* y *H. rostrata* en Brasil, una de sus conclusiones es que los individuos de la población de *H. rostrata* tienen mayor variabilidad genética. Melendez-Ackerman *et al.*, (2005) realizaron un estudio en las Islas del Caribe, de la distribución de la variación morfológica y genética utilizando AFLP, en poblaciones de *H. bihai*, especie muy polimórfica en el color de las brácteas. Esta condición es atribuida a la acción de los polinizadores, aunque otros procesos también pueden influir. Los niveles de polimorfismo de AFLP indicaron que la variación genética entre islas puede estar bajo regímenes evolutivos diferentes y está relacionada con fenómenos como selección, endogamia y fragmentación de hábitat que pueden estar operando por separado, a diferentes escalas espaciales. Sheela *et al.*, (2006) estudiaron 17

especies y cultivares de heliconias mediante la técnica molecular RAPD; los genotipos estudiados mostraron una alta correspondencia entre la variabilidad genética, morfológica y taxonómica de los genotipos estudiados. Lagomarsino y Kress (2007) realizaron un estudio tendiente a reconstruir la filogenia y evolución floral en *Heliconia* subgénero *Heliconia* y utilizaron cinco marcadores moleculares ETS, ITS, rpb2, psbA-trnH y trnLF, los resultados de este estudio han dado a conocer las relaciones entre especies de heliconias que han sido hipotetizadas previamente basados solo en datos morfológicos. Isaza-Valencia (2008) estudió la diversidad genética de 77 genotipos de Heliconias cultivadas, pertenecientes a las especies *H. caribaea*, *H. bihai*, *H. orthotricha*, *H. stricta*, *H. wagneriana*, *H. psittacorum* e híbridos de las mismas, mediante AFLP; la autora demostró que en la población de Heliconias estudiada hay una diversidad genética alta tanto a nivel intra como interespecífico que va desde 46% hasta el 97% de similitud. Del mismo modo, Cortés *et al.*, (2009) evaluaron diez microsatélites en 61 individuos de *Heliconia acuminata* encontrando de moderados a altos niveles de polimorfismo en los individuos estudiados y, concluyendo que los marcadores evaluados pueden tener gran utilidad para el entendimiento de la estructura genética espacial y análisis de parentesco útiles en estudios de la dinámica de esta especie en paisajes fragmentados.

Algunos trabajos como los de Marouelli (2009) y Marouelli *et al.*, (2010) estudian la variabilidad genética y las relaciones filogenéticas de 124 accesiones del género *Heliconia* basándose en marcadores RAPD y ADN de cloroplasto. Demostrando el origen monofilético del género y una agrupación de las accesiones en los subgéneros existentes, además una asociación de los híbridos con sus parentales, exceptuando al subgénero *Stenochlamys* el cual se clasificó como polifilético; Thangam *et al.*, (2010) evaluaron la diversidad morfológica y molecular de 4 especies y 4 cultivares de Heliconias de interés ornamental, utilizando marcadores RAPD. Los resultados mostraron unos coeficientes de similaridad genética que varió de 0.511 a 0.879 y la agrupación de los cultivares de *H. psittacorum* con los de *H. wagneriana*, y de la misma forma, Loges *et al.*, (2012) utilizaron Isoenzimas y marcadores RAPD y numerosos caracteres morfológicos para la selección de características agronómicas deseadas en el material de corte de Heliconias de uso comercial, seleccionando diversos caracteres morfológicos de gran importancia y reconociendo el potencial que tienen los marcadores moleculares y bioquímicos para establecer características sin la interferencia del ambiente.

Los estudios más recientes en Heliconias incluyen a Ramos Guimaraes *et al.*, (2012) que realizaron un análisis de diversidad genética de cultivares e híbridos interespecíficos de *H. psittacorum* utilizando regiones de ADN nuclear ITS1-ITS4;

ITS5-ITS4; ITS1-ITS2; ITS5-ITS2; ITS3-ITS4, EF11-EF22; y de cloroplasto: rps3'-rps5', trnL-trnF; trnS-trnF y trnS-trnL. Este estudio no encontró repeticiones ni duplicados de material genético entre los cultivares estudiados ni entre los híbridos. La información obtenida es promisorio para ser tomada en cuenta como un primer paso hacia el mejoramiento genético de *H. psittacorum*. Gowda *et al.*, (2012) desarrollaron microsatélites de *Heliconia* para ser usados en caracterizaciones genéticas de Heliconias caribeñas como *H. bihai* y *H. caribaea* con un alto potencial discriminatorio y con posibilidades para ser utilizados en estructura genética, patrones biogeográficos, entre otros, y por último, y complementario a su estudio en 2008, Isaza *et al.*, (2012) determinaron la variabilidad genética de 7 especies de Heliconias cultivadas en Colombia que sumaron 67 genotipos diferentes utilizando marcadores AFLP. Así mismo, realizaron una aproximación filogenética reflejando las asociaciones establecidas por datos morfológicos y moleculares.

5.2 Estabilidad genética y variación somaclonal

La familia Musaceae está ampliamente estudiada en este punto, y los AFLPs fueron pioneros para detectar variación somaclonal, es posible destacar el realizado por Engelborghs *et al.*, (1998) en donde evalúan el potencial de los marcadores AFLP para la detección de variantes somaclonales y caracterización de variedades de *Musa* spp. Los autores encontraron polimorfismo en el patrón de bandeo de variantes somaclonales con respecto a sus plantas madres como también pudieron diferenciar variedades de plátano por la presencia específica de bandas en cada una de las variedades evaluadas.

Uno de los modelos de estudio de variación somaclonal es el plátano, por lo tanto se han generado una cantidad de investigaciones base para el entendimiento de este comportamiento en muchos cultivos, de allí que análisis como el realizado por Sahjiram *et al.*, (2003) realizado en el plátano “Curare enano” (*Musa* spp.) en condiciones *in vitro*, en donde fueron evaluados tipos de variación y los factores que la incrementan, confirman que en este cultivo es frecuente la aparición de variación somaclonal durante la fase *in vitro*, por lo que hace imprescindible su análisis y Bairú *et al.*, (2006) los cuales evaluaron el efecto del tipo, la concentración de los reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas) y el subcultivo en un cultivar de banano utilizando marcadores moleculares RAPD, concluyendo que las plantas que poseen una alta tasa de multiplicación poseían una mayor tasa de variación genética incluso hasta del 72%.

Otros estudios que resaltan son los realizados por Ray *et al.*, (2006) que estudiaron los cultivares de banano (*Musa* spp.), Robusta (AAA), Giant Governor (AAA) y Martaman (AAB) analizando las relaciones y la fidelidad genética de los cultivares y plantas micropropagadas con marcadores RAPD e ISSR que revelaron la completa estabilidad genética del cultivar Martaman y tres variantes somaclonales de Robusta y tres de Giant Governor. Los autores concluyen que de los dos sistemas de marcadores utilizados, los ISSR detectan más polimorfismo que los RAPD y mostraron perfiles de ADN similares. Lakshmanan *et al.*, (2007) evaluaron la estabilidad genética utilizando RAPD e ISSR de un banano *Musa acuminata* var. Nanjanagudu Rasabale (NR), el cual fue propagado durante 10 años. Los autores no encontraron diferencias entre los clones, reportando una fidelidad genética en la propagación a largo plazo de esta especie. Silva *et al.*, (2009) analizaron mediante RAPD la inducción de variación somaclonal del cambur 'Manzano' (*Musa* AAB, banano tipo manzano) mediante el uso de elevadas concentraciones de citoquininas a través de multiplicaciones sucesivas, durante las cuales se aumentó de manera paulatina dichas las concentraciones de BAP (5-10-15 mg/L), encontrando un aumento de la brotación y poca variabilidad somaclonal con el incremento de la concentración de citoquininas relacionándolos con la presencia del genoma balbisiana dentro de esta variedad. Shirani *et al.*, (2010) estudiaron la variabilidad genética y fenotípica de somaclones inducidos por BAP y TDZ en plantas de banano usando marcadores RAPD concluyendo que la exposición a altas concentraciones de estas hormonas inducen una gran acumulación de variación genética comparada con los controles sometidos a una baja concentración hormonal, Lu *et al.*, (2011) utilizaron ISSR para la identificación de diferentes cultivares y el monitoreo de variaciones somaclonales durante la micropropagación en diferentes cultivares de banano encontrando amplificaciones homogéneas y perfiles de amplificación similares a la planta madre.

Incluso también se tienen estudios en plantas generadas a través de inflorescencias, es el caso de Harirah y Khalid (2006) que regeneraron plantas obtenidas de inflorescencias masculinas de *Musa acuminata* y evaluaron la estabilidad genética con el uso de RAPD, sin embargo de las 15 plantas evaluadas ninguna de estas mostró evidencias de variabilidad genética.

Finalmente, con respecto a las Heliconias, solo se ha registrado un trabajo con *H. bihai* cv. Lobster Claw I utilizando caracteres morfológicos como longitud de las plantas, forma y color de las hojas y de los pseudotallos, encontrando plantas con diferencias morfológicas expresadas en campo en la inflorescencia y otras enanas principalmente después del subcultivo 18 (Rodrigues, 2008).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Tecnológica de Pereira, Risaralda y en el Laboratorio de Genética Molecular del programa de Recursos Genéticos del Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Palmira, Valle.

6.1 Caracterización genética de *H. orthotricha* y *H. caribaea*

6.1.1 Material Vegetal

El material vegetal seleccionado para la caracterización genética del material fue colectado en el banco de germoplasma *in vivo* de Heliconias en el Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira y en el Vivero del Laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Se tomaron hojas jóvenes sin desenrollarse, comúnmente llamadas “hojas bandera”; las hojas colectadas fueron almacenadas con gel de Sílice en proporción 1:10.

En el laboratorio, las hojas secas se maceraron con nitrógeno líquido y se mantuvieron en congelador a -73 °C hasta el momento de la extracción de ADN.

Las especies y cultivares estudiados, y sus respectivos sitios de colecta son mostrados en la Tabla 1.

Para la caracterización genética de los materiales de *H. caribaea* y *H. orthotricha* propagadas *in vitro* fueron tenidos en cuenta 2 individuos de cada uno de los genotipos de investigación; además se incluyeron 9 genotipos o cultivares identificados de *H. caribaea* (Purpúrea, Príncipe de la Oscuridad, Escarlata, Barbados, Vulcano, Gold, Brazilian bomber, Salmón y Chartreuse), y 5 genotipos o cultivares de *H. orthotricha* (Tricolor, Filo de la noche, Arco iris, Roja y She) y un individuo perteneciente a *H. caribaea* bajo propagación *in vitro* (Anexo 4, Registro Fotográfico).

Tabla 1. Muestras y sitios de colecta del material de estudio

Muestra	Especie	Lugar de colecta
1	<i>H. orthotricha</i>	Viv UTP*
2	<i>H. orthotricha</i>	Viv UTP*
3	<i>H. orthotricha</i> cv. Tricolor	JBUTP**
4	<i>H. orthotricha</i> cv. Roja	MHC***
5	<i>H. orthotricha</i> cv. Filo de la noche	JBUTP**
6	<i>H. orthotricha</i> cv. Arco Iris	JBUTP**
7	<i>H. orthotricha</i> cv. She	Chinchiná
8	<i>H. caribaea</i>	Viv UTP*
9	<i>H. caribaea</i>	Viv UTP*
10	<i>H. caribaea</i> cv. Gold	JBUTP**
11	<i>H. caribaea</i> cv. Barbados	JBUTP**
12	<i>H. caribaea</i> cv. Chartreuse	JBUTP**
13	<i>H. caribaea</i> cv. Salmón	JBUTP**
14	<i>H. caribaea</i> cv. Vulcano	JBUTP**
15	<i>H. caribaea</i> cv. Principe de la oscuridad	JBUTP**
16	<i>H. caribaea</i> cv. Scarlata	JBUTP**
17	<i>H. caribaea</i> cv. Purpurea	JBUTP**
18	<i>Musa coccínea</i>	JBUTP**
19	<i>Ginger</i> sp.	JBUTP**
20	<i>H. caribaea</i> cv. Brazilian Bomber	JBUTP**
24	<i>H. caribaea</i> in vitro R18	LBV-UTP****
26	<i>H. orthotricha</i> cv. Filo de la noche (D)	JBUTP***

*Vivero Universidad Tecnológica de Pereira.

**Jardín Botánico Universidad Tecnológica de Pereira.

***Monasterio Hermanas Carmelitas Descalzas, Pereira.

****Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Tecnológica de Pereira.

6.1.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico de Heliconias fueron utilizados 2 protocolos de extracción de ADN. En las muestras numeradas como 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 19, 20 y 26 en la Tabla 1 se implementó el protocolo utilizado por Sheela *et al.*, (2006) para extracción de ADN de Heliconias (ANEXO 1) con una posterior purificación de las muestras siguiendo el método de Benbouza *et al.*, (2006). Con las muestras 1, 5, 14, 17 y 18, el ADN fue extraído con el Protocolo de Extracción del Laboratorio de Biología Molecular CIAT (ANEXO 2). Las diferencias entre estos dos protocolos se encuentran principalmente en los componentes del buffer de cada uno de estos.

Posterior a la extracción, una muestra de ADN total fue evaluado en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con SYBR® y visualizado mediante iluminación con luz ultravioleta, para constatar la calidad del ADN obtenido.

Así mismo, el ADN de todas las muestras fue cuantificado con el uso del Nanodrop®, normalizado y diluido a una concentración de 50 ng/μl.

6.1.3 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción amplificados (AFLP).

La obtención de AFLPs se realizó utilizando el kit Sistema de Análisis de AFLP I producido por Invitrogen® para ADN genómico.

6.1.3.1 Selección de combinaciones

Para la selección de las tres combinaciones para el estudio se realizaron ensayos con 8 combinaciones de cebadores (Tabla 2). Las 3 primeras diseñadas para *Musa* sp., propuestas por Ude *et al.*, (2003) y evaluadas por Isaza (2008) en Heliconias, las combinaciones 4 y 5 evaluadas por Wahyuni *et al.*, (2003) en *Ginger* sp., y otras 3 escogidas directamente de la guía del kit de AFLP por amplificar en plantas afines a las Heliconias. Luego, para el estudio se eligieron y analizaron los resultados obtenidos con 3 combinaciones de cebadores con tres nucleótidos selectivos, éstas fueron escogidas porque presentaban mayor polimorfismo. Las combinaciones seleccionadas fueron reamplificadas con todos los individuos de interés.

Tabla 2. Combinaciones de AFLPs evaluadas

Numeración	Combinación de Primers
1	E-ACC/M-CAG
2	E-AGC/M-CAG
3	E-ACG/M-CTG
4	E-AAC/M-CAC
5	E-ACC/M-CAA
6	E-AAG/M-CAC
7	E-AGG/M-CAG
8	E-AGG/M-CAC

6.1.3.2 Digestión, ligación de adaptadores y amplificación.

Para la amplificación con marcadores moleculares AFLPs fueron utilizados 8 µl de ADN a una concentración de 400 ng/µl. El cálculo anterior se realizó con el fin de propiciar una digestión y ligación acorde al tamaño del genoma de *Heliconia* y que vaya acorde a la concentración de la muestra y de las enzimas de restricción. El genoma de *Heliconia* tiene una longitud aproximada de 441 Mpb según Hanson *et al.*, (2001) y Leitch *et al.*, (2010).

Siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante, el ADN es cortado por la combinación de enzimas de restricción *Eco* RI y *Mse* I, luego los fragmentos son ligados a los adaptadores *Eco* RI y *Mse* I, se amplificaron y luego se re amplificaron con las combinaciones específicas más polimórficas.

Para este objetivo se amplificaron 22 muestras y 3 controles para la reacción de amplificación, ADN de tomate suministrado por la casa comercial del Kit de AFLP, muestra de ADN de Arecaceae y posteriormente un producto de PCR+1 previamente evaluado.

La visualización de los fragmentos se realizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6%. Las tinciones se realizaron con nitrato de plata (AgNO₃) siguiendo el método de Benbouza *et al.*, (2006); la lectura de las bandas se realizó con ayuda de un transiluminador de luz blanca y con cada uno de los geles se realizó un escaneo para el almacenamiento de la información. Las bandas que presentaron problemas en la lectura por poca resolución y nitidez en los geles (bandas borrosas), fueron descartadas para el estudio.

6.1.4 Análisis de información

Cada banda fue asumida como un locus dialélico, donde un alelo es la presencia de la banda, y el otro es la ausencia de ésta. De esta forma la matriz de datos fue obtenida por presencia o ausencia de bandas, registrándolas como 1 ó 0, respectivamente.

Las matrices de distancia genética y los dendrogramas de similaridad para evaluar la diferenciación o similaridad genética de los individuos de *H. caribaea* y *H. orthotricha* con respecto a los otros cultivares, fueron calculados utilizando el programa PAST ver. 2.17c (Hammer *et al.*, 2001). Se utilizó el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908). Para la construcción del dendrograma fue empleado el método UPGMA (*Unweighted Pairgroup Method with Arithmetic Average*).

6.2 Estabilidad Genética de *H. caribaea*

6.2.1 Material Vegetal

Las plantas utilizadas para la evaluación de la estabilidad genética se encontraban localizadas en el Vivero del Laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Tecnológica de Pereira y en condiciones *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Para las plántulas (Planta Madre) que se encontraban en vivero se tomaron hojas jóvenes sin desenrollarse, comúnmente llamadas “hojas bandera”, se realizó el procedimiento de deshidratación del material utilizando gel de Sílice previamente descrito.

Las plántulas de *H. caribaea* propagadas por cultivo *in vitro* (Figura 5) fueron establecidas a partir de meristemo floral siguiendo el protocolo de propagación reportado por Marulanda *et al.*, (2011) para la propagación *in vitro* de *H. bihai* cv. Lobster Salmón a partir de meristemos florales. Estas plantas se encontraban en medio de multiplicación MS (Murashige y Skoog, 1962), con una concentración hormonal de 2 mg/L de Bencilaminopurina (BAP) y 0.5 mg/L de Ácido Indol Acético (AIA) con cambio de medio cada 4 - 5 semanas y otras condiciones descritas por Londoño-Giraldo (2012) en la comparación y el seguimiento de protocolos de propagación *in vitro* de especies de heliconia de interés comercial. Estas plántulas fueron cortadas en cabina de flujo laminar, y el material vegetal fue procesado de la misma forma descrita anteriormente para la deshidratación y preservación con fines de extracción de ADN.

Se evaluaron 2 individuos en 4 líneas de micropropagación diferentes y fueron clasificados así:

C2: *H. caribaea* en proceso de propagación *in vitro*, subcultivo 2

C15: *H. caribaea* en proceso de propagación *in vitro*, subcultivo 15

C18: *H. caribaea* en proceso de propagación *in vitro*, subcultivo 18

Madre: *H. caribaea* mantenidas en condiciones de invernadero

Las especies y cultivares estudiados, y sus respectivos sitios de colecta son mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Material Vegetal para la evaluación de la estabilidad genética de *H. caribaea*

Muestra	Especie	Lugar de colecta
8	<i>H. caribaea</i>	Viv UTP*
9	<i>H. caribaea</i>	Viv UTP*
18	<i>Musa coccínea</i>	JBUTP**
19	<i>Ginger</i> sp.	JBUTP**
21	<i>H. caribaea</i> in vitro R15	LBV-UTP***
22	<i>H. caribaea</i> in vitro R15	LBV-UTP***
23	<i>H. caribaea</i> in vitro R2	LBV-UTP***
24	<i>H. caribaea</i> in vitro R18	LBV-UTP***
25	<i>H. caribaea</i> in vitro R18	LBV-UTP***

* Vivero Universidad Tecnológica de Pereira

** Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira

*** Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Tecnológica de Pereira



Figura 6. Material de *H. caribaea* utilizado para el estudio de la estabilidad genética. **a.** Plántulas en condiciones de invernadero **b.** Plántulas en condiciones *in vitro*

6.2.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico de Heliconias fueron implementados 3 protocolos de extracción de ADN. En las muestras numeradas como 8, 9, 19, de la Tabla 3 se implementó el protocolo utilizado por Sheela *et al.*, (2006) para extracción de ADN de Heliconias (ANEXO 1) con una posterior purificación de las muestras siguiendo el método de Benbouza *et al.*, (2006). En las muestras 23, 24 y 25 el ADN fue extraído con el Protocolo de Extracción del Laboratorio de

Biología Molecular CIAT (ANEXO 2). Por último, el ADN de las muestras 21 y 22 fue extraído con el Kit DNeasy Plant Mini de QIAGEN™, catálogo No. 69104.

Posterior a la extracción, la tinción, visualización y cuantificación del ADN total fue realizado de la manera anteriormente descrita en la caracterización genética.

6.2.3 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción amplificados (AFLP).

La amplificación de los marcadores moleculares AFLP para la evaluación de la estabilidad genética son similares y descritos minuciosamente en la sección anterior de caracterización genética.

6.2.3.1 Selección de combinaciones

Para la selección de las tres combinaciones para esta parte del estudio se realizaron amplificaciones similares a las descritas en la sección anterior de caracterización molecular y las 8 combinaciones de cebadores evaluadas se encuentran consignadas en la Tabla 2. . Las combinaciones seleccionadas fueron reamplificadas con todos los individuos de interés.

6.2.3.2 Digestión, ligación de adaptadores y amplificación.

Para este objetivo se amplificaron 9 muestras y 3 controles para la reacción de amplificación, ADN de tomate suministrado por la casa comercial del Kit de AFLP, muestra de ADN de Arecaceae y posteriormente un producto de PCR+1 previamente evaluado.

La digestión de fragmentos, ligación de adaptadores, la amplificación y visualización de los productos de PCR fueron análogas y descritas en la sección anterior de caracterización genética.

6.2.4 Análisis de información

El análisis estadístico utilizado es semejante al descrito en la sección anterior. Las matrices de distancia genética y los dendrogramas de similaridad para evaluar la estabilidad genética de los “clones” *in vitro* de *H. caribaea* en diferentes fases de multiplicación, fueron calculados utilizando el programa PAST ver. 2.17c (Hammer *et al.*, 2001). Para dicho cálculo se utilizó el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908). Para la construcción del dendrograma fue empleado el método UPGMA (*Unweighted Pairgroup Method with Arithmetic Average*).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Extracción de ADN

Con el protocolo de extracción de ADN propuesto por Sheela *et al.*, (2006) (ver ANEXO 1), los valores de pureza medidos en A260/A280 estuvieron en promedio en 1.87 y la concentración estuvo alrededor de los 630 ng/μl.

La extracción de ADN con el Kit DNeasy de Qiagen® es muy práctica y se evita por completo el contacto con químicos peligrosos, la concentración de ADN de las muestras fue de 14 ng/μl en promedio

Finalmente con el protocolo de extracción del Laboratorio de Biología Molecular CIAT (ver ANEXO 2), los promedios de pureza A260/A280 fueron de 1.86 y la concentración de 253 ng/μl, y se necesita muy poco material vegetal inicial.

Los estudios de diversidad genética que esten asociados a marcadores moleculares, plantean la necesidad de tener métodos más precisos y eficientes de extracción de ADN, de allí la importancia de encontrar el método de extracción que favorezca el objetivo de estudio y las características del material vegetal.

7.2 AMPLIFICACION DE AFLPs

De las 8 combinaciones de cebadores evaluadas las más polimórficas y con mayor número de bandas para las especies y los cultivares estudiados fueron las combinaciones E-AAC/M-CAC (C4) (Figura 7), E-ACC/M-CAA (C5) y E-AGG/M-CAC (C8). En este trabajo solo se consideraron aquellas bandas de mayor intensidad, los cuales dieron como resultado un total de 12, 19 y 18 bandas polimórficas con los tres marcadores seleccionados respectivamente a través de los 26 genotipos evaluados (incluyendo las plantas de caracterización y estabilidad genética). El rango de lectura se realizó entre 70-320 pb para todas las combinaciones.

Tabla 4. Características generales de las combinaciones de primers evaluados

NUMERO	COMBINACIÓN	AMPLIFICACION		% DE POLIMORFISMO		
		SI	NO	SI		NO
				INTER**	INTRA***	
1	E-ACC/M-CAG	X		98	88	
2	E-AGC/M-CAG	X		96	90	
3	E-ACG/M-CTG	X		90	85	
4	E-AAC/M-CAC*	X		100	100	
5	E-ACC/M-CAA*	X		100	100	
6	E-AAG/M-CAC	X		90	65	
7	E-AGG/M-CAG		X			X
8	E-AGG/M-CAC*	X		100	100	

* Combinaciones seleccionadas

** Interspecífico

*** Intraespecífico

Las 3 combinaciones de cebadores seleccionadas para las reacciones de AFLP, amplificaron en el 100% de los individuos evaluados y permitieron obtener los perfiles moleculares de los veintiséis (26) genotipos de heliconias relacionadas para los dos objetivos de este trabajo.

En total con las tres combinaciones seleccionadas se obtuvieron 49 bandas, de las cuales el 100% resultaron polimórficas tanto intra como interespecíficamente, lo que quiere decir que no hubo presencia de bandas similares ni entre los cultivares ni entre las dos especies. Todas las combinaciones de cebadores utilizadas permitieron detectar diferencias en los patrones de amplificación y estimar las distancias genéticas entre estos genotipos. Normalmente con el uso de los AFLP se logra una amplificación de 50 a 100 fragmentos en cada reacción (Bassam *et al.*, 1991), sin embargo, es necesario tener en cuenta que estas bandas fueron seleccionadas dentro de un intervalo de tamaño molecular y se eliminaron algunas bandas para evitar el ruido de lectura.

Una parte de las combinaciones de cebadores utilizados en este estudio fueron tomadas de trabajos realizados en Heliconias y afines; las combinaciones 1, 2 y 3 (Tabla 4) evaluadas fueron las propuestas por Ude *et al.*, (2003), diseñadas para *Musa* y amplificaron para los genotipos evaluados. Isaza (2008) reporta con estos mismas combinaciones polimorfismos de 100% en Heliconias, lo que es comparable en este trabajo con la observación de bandas monomórficas especialmente a nivel intraespecífico y polimorfismos por encima del 90 pero no de 100% (Tabla 4).

Las combinaciones 4 (Figura 7) y 5 en este estudio mostraron un polimorfismo de 100% a un nivel tanto intra como interespecífico, siendo ambas seleccionadas (Tabla 4). Estas dos combinaciones fueron evaluadas en *Ginger* sp. por Wahyuni *et al.*, (2003) siendo las más polimórficas en su trabajo (16 y 21% respectivamente), sin embargo es necesario resaltar que ellos utilizaron primers de 4 pares de bases, por lo tanto el polimorfismo en teoría debe ser mayor al evidenciado con el uso de cebadores de tres pares de bases.

Y por último dentro de las combinaciones numeradas como 6, 7 y 8 (Tabla 4) escogidas directamente de la guía adjunta al kit de AFLP de Invitrogen® por amplificar en plantas afines a las Heliconias, solo fue escogida la combinación 8 (E-AGG/M-CAC) al mostrar un polimorfismo de 100% a nivel intra e interespecífico. El patrón de amplificación obtenido en los geles con la combinación 7 no permitió la distinción de bandas bien definidas que se pudieran leer con claridad por lo que no se incluyó en el análisis de datos.

La técnica de los AFLP puede detectar un buen número de polimorfismos con tan solo uno o dos pares de cebadores, en este caso y debido al número de individuos evaluados las tres combinaciones seleccionadas fueron suficientes para lograr los objetivos propuestos. Los datos expuestos muestran que, para muchas especies, la técnica de los AFLP resulta ventajosa sobre otras técnicas anteriormente utilizadas como los RAPD para evaluar la variación entre individuos de plantas, entre callos y entre plantas donadoras y callos embriogénicos, así como para diferenciar y caracterizar genotipos estrechamente relacionados.

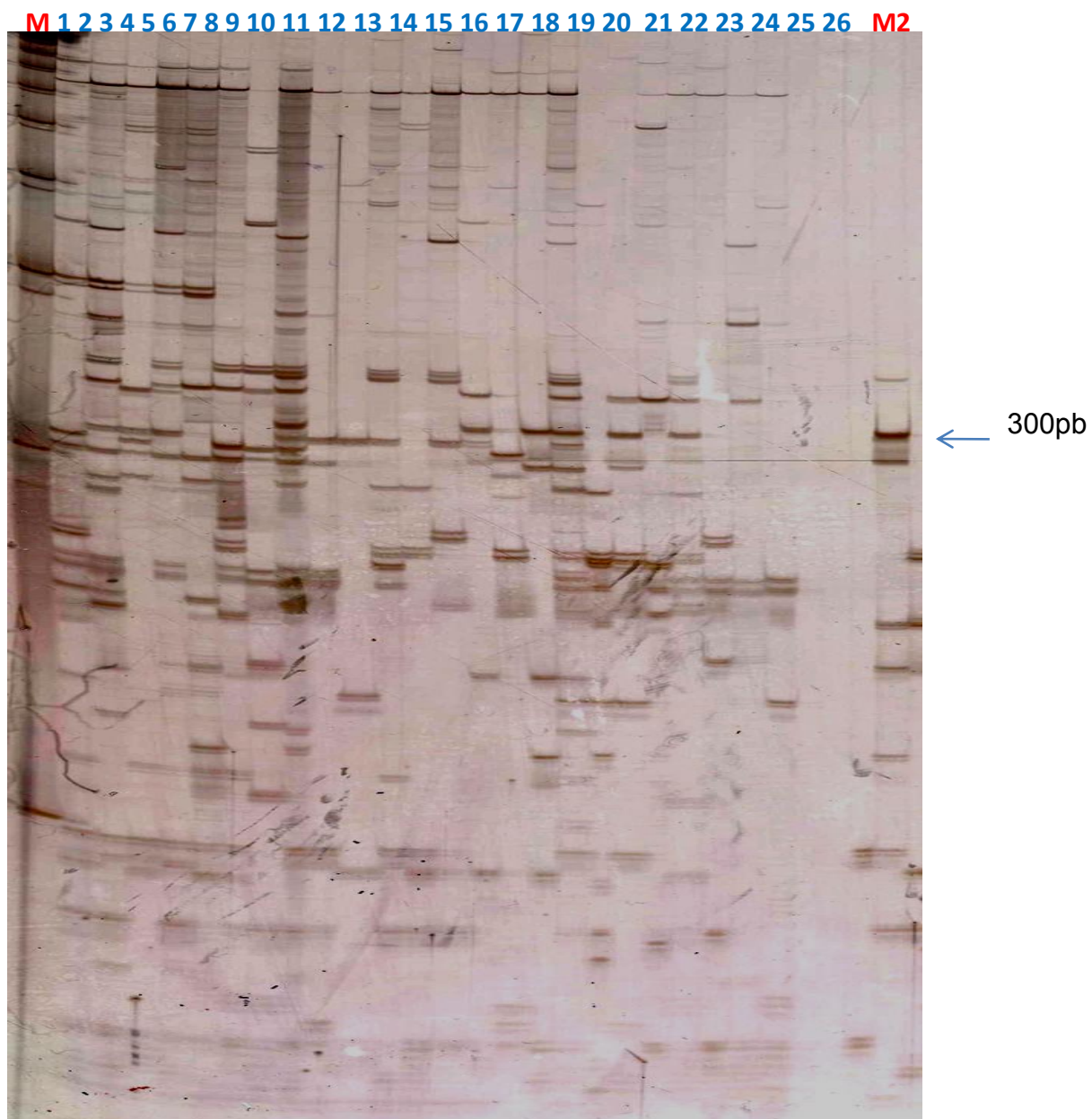


Figura 7. Sección de gel de electroforesis de poliacrilamida donde se observan los perfiles de ADN obtenidos con AFLPs con la cuarta combinación de cebadores (E- AAC/M-CAC) M: 1Kb *Plus Ladder* (Invitrogen), M2: 10 pb *marker*.

7.3 Caracterización molecular de *H. caribaea* y *H. orthotricha*

El dendrograma obtenido con las 49 bandas arrojadas por las 3 combinaciones de *primers* AFLPs utilizadas en este estudio, muestra dos grupos claramente definidos, las cuales se separaron a una distancia genética de 0.28 (Figura 8).

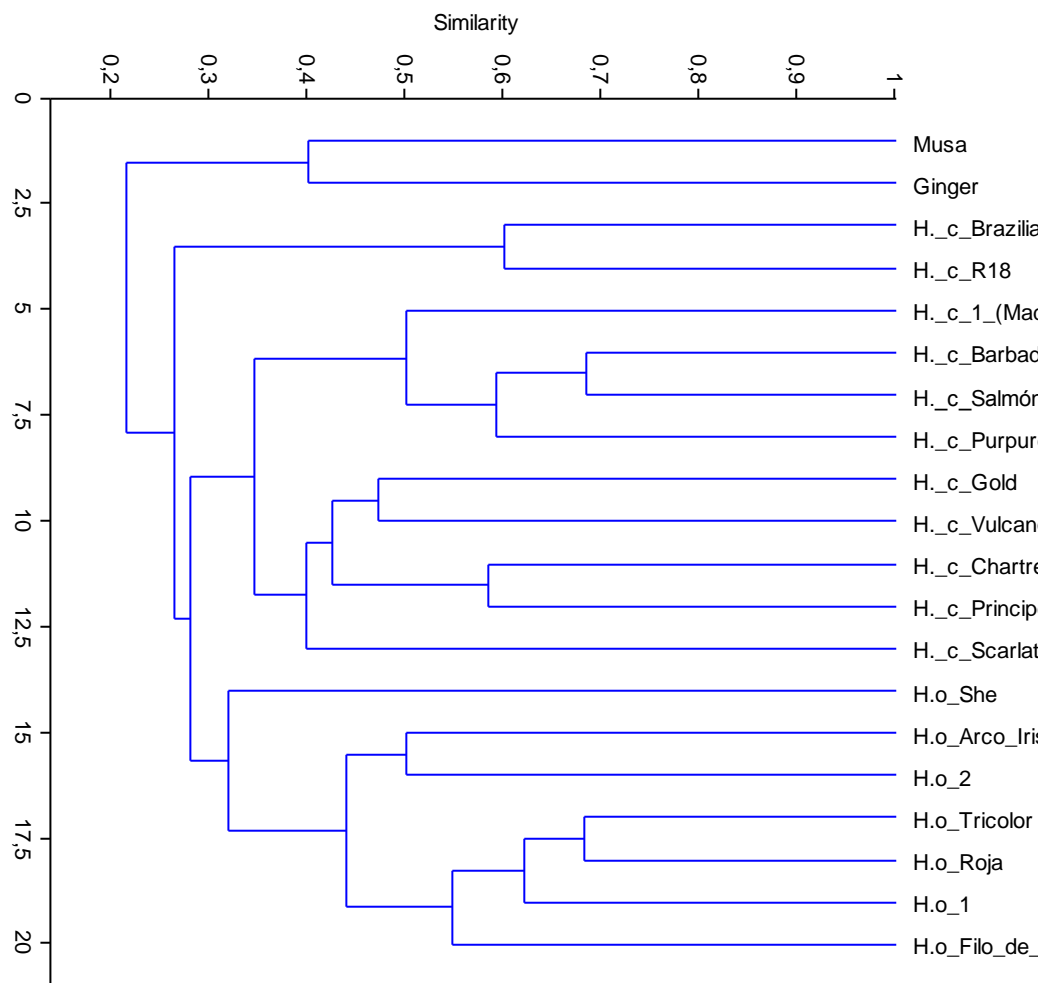


Figura 8. Dendrograma de similaridad según el índice de similitud de Jaccard de la agrupación de *H. orthotricha* y *H. caribaea* y algunos cultivares de las dos especies.

Estos grupos reflejan una asociación entre individuos pertenecientes a la misma especie pero de diferentes cultivares e indica una clara asociación de los cultivares de *H. orthotricha* previamente identificados con los individuos que

presuntamente pertenecen a esta especie. Por otra parte los individuos previamente rotulados como *H. caribaea* aparecen asociados al cluster que agrupa los cultivares de esta especie. A pesar del gran polimorfismo encontrado fue posible observar que solamente 3 bandas (C5B17, C4B6 y C4B9) amplificaron únicamente en individuos incluidos dentro del grupo de *H. caribaea*. En cambio 9 bandas (C5B2, C5B12, C5B15, C8B2, C8B6, C8B7, C8B14, C8B17 y C4B12) resultaron exclusivas para la diferenciación de los individuos agrupados dentro de la especie *H. orthotricha*. Para las dos especies no hubo bandas exclusivas relacionadas con algún cultivar específico.

Haciendo un análisis de agrupamientos, el grupo denominado *H. caribaea* presenta dos grupos el primero separado principales ramificaciones a una distancia de 0.27, en donde un grupo está compuesto por el cultivar Brazilian Bomber y por un individuo rotulado inicialmente como *H. caribaea* proveniente de propagación in vitro en R18. El otro grupo se divide en dos subgrupos principales a una distancia de 0.35, un subgrupo lo conforman los cultivares Purpúrea, Barbados y Salmón junto con el otro genotipo de *H. caribaea* proveniente de vivero, y separado de estos a una distancia de 0.5. Los cultivares Barbados y Salmón presentan la mayor similaridad genética con un índice de 0.69. El otro subgrupo empieza a ramificarse en 0.4 y contiene los otros cultivares incluidos en el estudio, Gold, Vulcano, Chartreuse, Príncipe de la Oscuridad y Scarlata. Dentro de este último cluster los individuos de los cultivares Chartreuse y Príncipe de la Oscuridad presentaron la mayor similitud genética con un valor de 0.59

El agrupamiento denominado *H. orthotricha*, el cual está compuesto por 7 individuos que incluyen los 2 genotipos de estudio y 5 cultivares de comparación, presentó una primera subdivisión a una distancia de 0.31, en donde se separó el cultivar She de las otras plantas estudiadas. El grupo restante mostró 2 subgrupos que se separaron a una distancia de 0.42, uno de ellos se separa y tiene una similitud de 0.5 y está compuesto por el cultivar Arco Iris y una de las Heliconias propagadas in vitro inicialmente rotulada como *H. orthotricha*. Finalmente la última agrupación empieza con la separación del cultivar Filo de la Noche que mostró una similaridad de 0.55 con respecto al cluster en donde se agrupan con una similitud de 0.62 el otro genotipo de *H. orthotricha* estudiado y los cultivares Tricolor y Roja que presentaron el mayor índice de similaridad con un valor de 0.69.

Los resultados arrojados en este dendrograma coinciden con una clasificación natural de las Heliconias y relacionado en estudios moleculares en los cuales sobresale la tendencia de los individuos de agruparse por especie (Sheela *et al.*, 2006; Isaza, 2008; Marouelli 2009; Marouelli *et al.*, 2010; Marulanda *et al.*, 2011b, Isaza *et al.*, 2012).

De acuerdo a las asociaciones presentadas en estos resultados es posible resaltar:

Los 2 individuos de comparación (o grupos externos) pertenecientes a los géneros *Musa* sp. y *Ginger* sp., fueron los más alejados en el dendrograma de similitud con una similaridad de 0.2. Lo anterior muestra las diferencias genéticas reflejadas a nivel de orden y la separación del grupo principal compuesto por ejemplares del género *Heliconia*. Resultados similares son descritos por Kumar *et al.*, (1998), Isaza, (2008) y Marulanda *et al.*, (2011) con índices de similitud entre 0.3 y 0.4 evidenciando la separación taxonómica y filogenética de las heliconias con respecto a otras familias botánicas incluidas en el análisis.

Las muestras 3, 4, 5, 6 y 7 (Tabla 1) (que corresponden a 5 cultivares de *H. orthotricha*) presentaron valores de similaridad que variaron entre 0.31 hasta 0.69 dentro del grupo. Los resultados de este estudio concuerdan en agruparlas dentro de un mismo cluster el cual permite posicionarlas y relacionarlas a nivel de especie como *H. orthotricha*. Complementario a lo anterior en el análisis del dendrograma, las muestras 1 y 2 quedaron agrupadas en el mismo cluster de las muestras ya mencionadas, siendo probablemente algún cultivar perteneciente a la especie *H. orthotricha*. Sin embargo a la hora de relacionar estos dos genotipos con un cultivar en específico, los resultados no mostraron una consistencia ni una relación directa entre los individuos analizados y un genotipo determinado. Cervera *et al.* (1998), propusieron que si el número de AFLP analizados es suficientemente grande, y las muestras en estudio presentaban más de un 90% de similitud podrían ser considerados como de la misma variedad, representando que genotipos muy similares difieren únicamente en unos pocos loci.

Marulanda *et al.*, (2011b) reportan que especies como *H. orthotricha* tienen una variabilidad genética intra-específica cercana al 50% lo cual se ajusta a los parámetros de similaridad y variabilidad encontrados para los individuos de esta especie dentro de esta investigación. Estos resultados permiten corroborar la existencia de una alta variabilidad intra-específica e intra-poblacional presente en las heliconias (Isaza, 2008) siendo coherente con la variabilidad fenotípica que ostenta esta especie.

Los individuos determinados dentro de la especie *H. caribaea* pertenecientes a las muestras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 24 y que corresponden a diversos cultivares y los individuos de estudio mostraron una agrupación con una similaridad que varió desde 0.28 hasta 0.68. Las relaciones entre los individuos reflejados en el análisis presentan algunas características que vale la pena resaltar. La primera es que los resultados de los marcadores AFLPs sugieren una mayor cercanía de los cultivares de *H. caribaea* Purpúrea, Barbados y Salmón con respecto a los otros cultivares analizados. La segunda es el distanciamiento un poco mas evidente en el dendrograma de un individuo propagado *in vitro* y asociado con el cultivar Brazilian Bomber.

La identificación de especies y cultivares se ha basado principalmente en diferencias morfológicas y coloración de flores e inflorescencias (Berry y Kress, 1991). Esto ha causado confusión principalmente cuando se trabaja con plantas juveniles que no han entrado en su etapa reproductiva ya que muchas características de tamaño o color de la hoja o del pseudotallo pueden variar a lo largo de su ciclo de vida. Es más, con Heliconias específicamente han podido observarse diferencias en la coloración de la inflorescencia de un cultivar debido al cultivo en diferentes condiciones ambientales y altitudinales, lo que se convierte en un inconveniente muy grande al momento de hacer caracterizaciones o de unificar el nombre de los cultivares de ciertas especies.

Las diferencias en las inflorescencias de algunos cultivares pueden llegar a ser tan sutiles o subjetivas que es muy común que los cultivadores presenten numerosas confusiones a la hora de relacionar y determinar variedades cultivadas (Marulanda *et al.*, 2011). De aquí que las herramientas moleculares están siendo fuertemente utilizados para la identificación rápida y precisa de Heliconias silvestres y variedades comerciales (Meléndez-Ackermán *et al.*, 2005; Isaza, 2008; Marulanda *et al.*, 2011; Isaza *et al.*, 2012). En este caso es adecuado afirmar que los individuos sin identificación pertenecen a la especie *H. caribaea*, pero como ocurre con el otro genotipo analizado, no existen datos concluyentes a nivel de cultivar, debido a la alta variabilidad intraespecifica que también presentó esta especie que la puedan asociar a estas plantas con un cultivar específico.

Las relaciones de los genotipos evaluados en esta investigación se enlazan a lo anteriormente relacionado por Isaza (2008), Marulanda *et al.*, (2011b) e Isaza *et al.*, (2012) en donde se evidencia la alta variabilidad genética tanto intra específica como intra poblacional, presente en las heliconias.

La técnica de AFLP se ha considerado la mejor alternativa para detectar mayor cantidad de polimorfismos en cualquier genoma en un solo experimento (Valadez *et al.*, 2001; Pejic *et al.*, 1998). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que aunque los marcadores AFLP pueden detectar una alta variabilidad en genoma, esta variabilidad intraespecífica en el caso de las Heliconias puede ser un inconveniente con el uso de AFLP, ya que en este punto, estos marcadores no son los indicados para reflejar unas relaciones intraespecíficas claras. En este sentido, como lo demostraron Kumar *et al.* (1998), Isaza, (2008) y Marulanda *et al.* (2011), el uso de marcadores AFLP para Heliconias tiene una gran utilidad para evidenciar relaciones interespecíficas, sin embargo para analizar genomas intraespecíficos con alta variabilidad como es el caso de las Heliconias no es tan conveniente y puede conllevar a confusiones.

Los resultados de esta investigación muestran la utilidad y aplicabilidad de los marcadores moleculares AFLP para la realización de estudios de caracterización genética entre especies de *Heliconia*, relacionando lo enunciado por Mueller y Wolfenbarger (1999) y Chial (2008) que afirman que la gran utilidad de los AFLP es en la diferenciación de individuos estrechamente relacionados. En este trabajo se demostró con certeza que los individuos rotulados como O (muestras 1 y 2), y como C (muestra 9 y 24) pertenecen a la especie *H. orthotricha* y *H. caribaea* respectivamente, sin embargo no existe un porcentaje de similitud lo suficientemente alto con el patrón de bandas obtenido para establecer una relación genética de algún cultivar en particular con estos individuos.

Estudios de diversidad y variabilidad genética con Heliconias relacionan incluso una variabilidad genética tan alta que puede asociar a nivel molecular a especies como *H. caribaea* con otras Heliconias de interés comercial, tal es el caso de la relación con *H. bihai* (Lagomarsino y Kress, 2007; Isaza, 2008; Marouelli, 2009; Marulanda *et al.*, 2011), inclusive en el análisis de los dendrogramas de los estudios relacionados muestran la inclusión de individuos de ambas especies en los mismos clusters con índices de similaridad cercanos a 0.7. Una consecuencia de esta afinidad genética es la presencia de híbridos naturales de estas dos especies que tienen un pasado geográfico, ecológico y co-evolutivo en común (Lagomarsino y Kress, 2007).

Adicional a la diversidad genética a nivel intra e interespecífico que refleja el grupo, es necesario tener en cuenta que los genotipos en cuestión de *H. orthotricha* y de *H. caribaea* provienen de un proceso de micropropagación, razón por la cual, la variación genética podría aumentar debido a este escenario. Martínez *et al.*, (2007) afirman para plantas de *Musa* sp. que las variaciones

encontradas en las muestras pueden deberse no solo a las diferencias entre individuos sino también a la variación somaclonal posible, como resultado de la continua propagación *in vitro*.

7.4 Estabilidad genética de *H. caribaea*

El análisis de agrupamiento para el material de *H. caribaea* en estudio (Figura 9), propagado en condiciones *in vitro*, realizado a partir de los perfiles obtenidos por los marcadores AFLP mediante el algoritmo de similitud de Jaccard y el algoritmo de agrupamiento UPGMA, muestra que no hubo ningún individuo genéticamente igual.

En el dendrograma (Figura. 9) es posible observar la separación de dos grupos de plantas, a una distancia de 0.27. De allí, uno de los grupos se encuentra conformado por los clones de *H. caribaea* en los subcultivos 2, 15 y 18 (R2, R15 y R18), con una similitud de 0.4 y entre éstos, los más similares (0.51) fueron los individuos de los subcultivos 2 y 18 (R2 y R18). La otra ramificación está compuesta por el genotipo identificado como madre en el proceso *in vitro*.

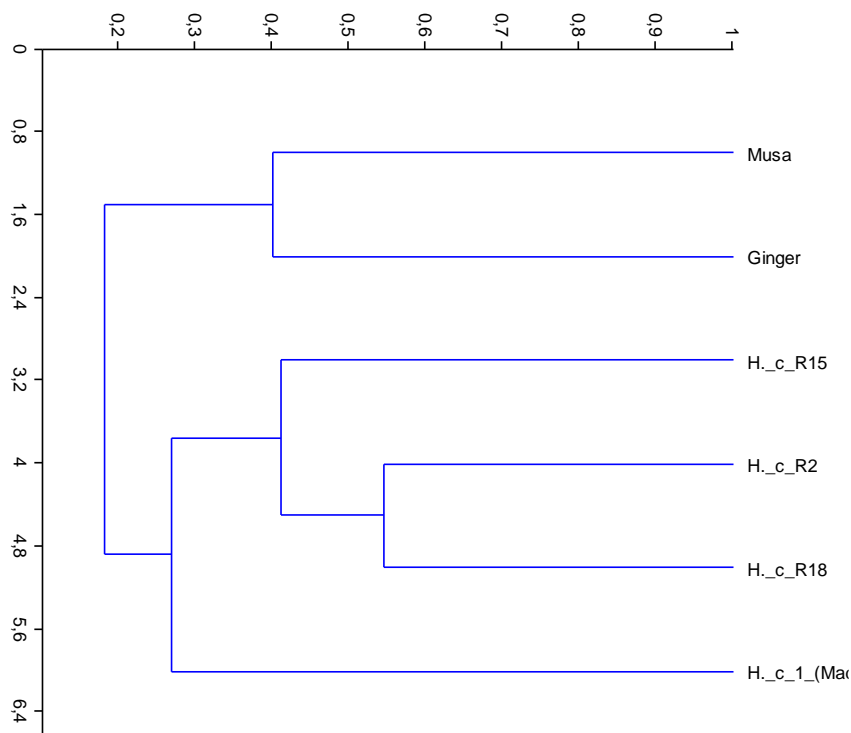


Figura 9 Dendrograma de similaridad, basado en el índice de similitud de Jaccard de la agrupación plantas micropropagadas de *H. caribaea*

Los índices de similaridad de las plantas evaluadas en este ensayo se encuentran en rangos que van desde 0.27 hasta 0.57. Considerando que las plantas de *Heliconia* analizadas provienen de una multiplicación clonal por técnicas *in vitro*, y que a nivel fenotípico no se observan diferencias entre las plantas que sugieran alguna variación de importancia, debiera esperarse una uniformidad en los valores y una menor variabilidad entre estos. Existen algunos estudios en donde los rangos de variación son igualmente altos, Medina *et al.*, (2007) compararon huellas genéticas mediante AFLP de embriones somáticos, plantas regeneradas y plantas de campo de lúpulo, encontrando un 67% de polimorfismo que permitió la detección de variantes somaclonales, e incluso se ha detectado un porcentaje de variación de hasta con 98,6% en el forestal *Carya illinoensis* (Vendrame *et al.*, 1999) y en plantas de *Arabidopsis thaliana* regeneradas a partir de callos embriogénicos las cuales mostraron 99,4% de polimorfismo (Polanco y Ruiz 2002).

El dendrograma obtenido para la estabilidad genética de *H. caribaea*, muestra un punto interesante: La evidente diferenciación entre todos los individuos seleccionados con respecto a la planta madre, reflejado en este caso por los marcadores moleculares AFLPs.

En este sentido y a pesar de los pocos individuos analizados, se logró evidenciar la falta de la homogeneidad genética dentro de las plantas micropropagadas, y es posible sugerir con respecto a estos resultados y basados solamente en marcadores AFLP, que las plantas micropropagadas de *H. caribaea* presentan tasas altas de variación somaclonal desde subcultivos bajos (R2) hasta el incremento de subcultivos en el tiempo (R15 y R18); caso similar al encontrado en un estudio con *Musa* spp. en el cual, mediante el estudio por marcadores RAPD se encontró que plantas *in vitro* presentaban genotipos diferentes en comparación con los tejidos originales de los cuales fueron generados (Newbury *et al.*, 2000).

Evans y Sharp (1988) relacionaron cuatro variables críticas para ocurrencia de variación somaclonal: el genotipo, el origen del explante, el período de cultivo y las condiciones del medio; es por esto que el desarrollo que sigue un explante durante su morfogénesis *in vitro* y todas las condiciones del medio son elementos claves para relacionar la ocurrencia y los factores críticos que conllevan a evidenciar variación somaclonal.

Uno de los aspectos mas reelevantes se da con respecto al tipo y origen de explante, los tejidos altamente diferenciados como raíces, hojas, flores y tallos

generalmente producen más variantes somaclonales que los explantes originados a partir de yemas apicales o brotes axilares que poseen meristemos preexistentes (Sahiram *et al.*, 2003, Bairú *et al.*, 2011). Complementario a lo anterior, para la propagación de bananos, plátanos y afines, el cultivo de meristemos apicales es el más usado y también es considerado como el más recomendable para garantizar la estabilidad genética de plantas obtenidas (Mante y Tepper, 1983).

Es necesario tener presente que estas plantas se originaron a través del establecimiento de meristemos florales siguiendo el protocolo propuesto por Marulanda *et al.*, (2011) para *H. bihai* cv. Lobster Salmón y, que la regeneración de plantas a partir de este explante requirió una desdiferenciación morfológica y una reorganización de células programadas para convertirse en partes florales a un cultivo de células totipotentes de las cuales serán regeneradas plantas. Harirah y Khalid (2006) regeneraron plantas obtenidas a partir inflorescencias masculinas de *Musa acuminata* sin embargo, al evaluar mediante RAPD la estabilidad genética, ninguna de estas mostró evidencias de variabilidad. No obstante, el resultado anterior no descarta alteraciones en el estado de metilación del ADN provocados por la manipulación en la desdiferenciación-reorganización de explantes (Sahiram *et al.*, 2003), que puede conllevar a una mayor susceptibilidad de generar variación somaclonal durante la propagación *in vitro*. Kaeppler *et al.*, (2000) incluyen mecanismos epigenéticos como parte del proceso de desarrollo de las plantas, incluso relacionan que los primeros subcultivos (incluso R0), pueden variar mucho mas que el resto de la progenie, y que este cambio en este caso tuvo que haber sido necesario para la totipotencia de estas células y la morfogénesis, en este caso evidenciada desde las yemas florales hasta los brotes en multiplicación. Sin embargo los mismos autores también aclaran que muchas veces estos cambios son pasados por alto, debido principalmente a que no son evidentes a nivel fenotípico en las plantas regeneradas.

Complementario a lo anterior Bairú *et al.*, (2011) resaltan la susceptibilidad de ciertos genotipos a experimentar variación somaclonal, en el caso de Heliconias no existen trabajos reportados con marcadores moleculares que permitan comparar si ciertos cultivares de *H. caribaea* u otras especies de Heliconia presentan una mayor o menor susceptibilidad a cambios genéticos producidos durante el cultivo *in vitro*. Sin embargo, la variación somaclonal a escala fenotípica observada en plantas propagadas de *H. bihai* (Rodrigues, 2008) evidencia e incrementa las posibilidades de encontrar diferencias moleculares que sustenten un cambio genético en clones micropropagados en Heliconias. Para *Musa*, Engelborghs *et al.*, (1998) demostraron el potencial de los AFLP para detectar las diferencias genéticas y variantes somaclonales en diferentes genotipos de *Musa*

spp. y Martinez *et al.*, (1998) relacionan que ciertos cultivares de *Musa* exhiben diferencias en la estabilidad genética, en la cual algunos son más estables que otros, este es el caso de los cultivares de banano (*Musa* spp.), Robusta (AAA), Giant Governor (AAA) y Martaman (AAB) propagados en condiciones similares, en los cuales los marcadores RAPD e ISSR revelaron la completa estabilidad genética del cultivar Martaman y variantes somaclonales en Robusta y en Giant Governor (Ray *et al.*, 2006).

Los brotes de *H. caribaea* se multiplicaban en un medio de cultivo que contenía 2mg/L de BAP y 0,5 mg/L de AIA (Londoño-Giraldo, 2012), pero dentro del protocolo de inducción de brotes descrito por Marulanda *et al.*, (2011), los explantes eran sometidos durante cierto tiempo en un medio que contenía 6 mg/L de BAP. Adicionalmente, las plantas alcanzaron a propagarse hasta el subcultivo 18. Diversos autores como Pierik (1990) y De Klerk *et al.* (1990) señalan que los explantes sometidos a elevadas concentraciones de citoquininas y el número de subcultivos realizados, incrementan la variabilidad genética y con ello la aparición de variantes somaclonales. Los resultados alcanzados en este trabajo sugieren que tanto la influencia de las altas concentraciones hormonales como el número de subcultivos realizados pueden estar relacionados con las diferencias en las huellas genéticas de los genotipos evaluados.

El hecho de que el individuo perteneciente al subcultivo 2 (R2) y los otros subcultivos presenten una distancia genética considerable con los individuos madre sugiere la influencia de factores que produjeron cambios al inicio de la propagación *in vitro*, ya sea promovido por la concentración de citoquininas o por la naturaleza del explante como se había mencionado con anterioridad. Kaeppler *et al.*, (2000), mencionan que uno de los aspectos mas importantes que relacionan cambios epigenéticos desde los primeros subcultivos, es la evidencia de cambios en la metilación del ADN especialmente al principio del proceso de propagación, los cuales decrecen en su progenie. En este caso las diferencias genéticas de la planta madre con la muestra R2 pueden ser mayores debido a las condiciones generadas por la naturaleza del explante y las condiciones iniciales de las hormonas. Sin embargo como se mencionaba con anterioridad, estos cambios son pasados por alto debido a que las plantas presentan características fenotípicas similares a la original. En Heliconias, Rodrigues (2008), utilizando caracteres fenotípicos no encontró variaciones en los primeros subcultivos de *H. bihai* cv. Lobster Claw I, solo en las plantas que superaban los 18 subcultivos en el proceso de propagación.

En la propagación de plantas afines, Bairu *et al.*, (2006) observaron un incremento en la tasa de ocurrencia de variantes con el progresivo incremento de los subcultivos de bananos micropropagados, Sahijram *et al.*, (2003) mencionan que la variación somaclonal puede aparecer después de tres a ocho pases, en el caso de diferentes variedades de banano, e incluso Rodrigues *et al.*, (1998) mostraron variantes somaclonales de banano desde el quinto subcultivo (1.3%) con un incremento de estos a 3.8% en el subcultivo 11. La diferenciación de los perfiles genéticos de los individuos de los subcultivos 15 y 18 podría estar relacionada con esta causa en particular. Lo anterior probablemente se debe a la acumulación de alteraciones genéticas, cambios epigenéticos y mutaciones (Sahijram *et al.*, 2003; Cardone *et al.*, 2004) o a una metilación de fragmentos de ADN debido a ciertas condiciones medioambientales de desarrollo (Kaeppler *et al.*, 2000) ó de estrés que hacen que el perfil de bandas generado por los AFLPs sea diferente (Donini *et al.*, 1997).

Lakshmanan *et al.*, (2007) mencionan que la causa exacta de variación somaclonal en micropropagación es desconocida, aunque se cree que las alteraciones anteriormente nombradas y otras como las proporciones de auxinas-citoquininas, la duración del cultivo, estrés *in vitro* dado por condiciones no naturales o por ritmos de iluminación alterados o condiciones nutricionales; juntas o independientes son responsables.

A nivel morfológico el límite de variabilidad considerado como aceptable por el mercado de las flores, específicamente en *Heliconias* es aproximadamente de 5% (Rodrigues, 2008); a nivel molecular, Douhovnikoff y Dodd (2003) haciendo uso de los marcadores AFLP establecieron un umbral de similitud genética mayor de 0.983 para la identificación de clones; teniendo en cuenta este valor en este trabajo, los bajos porcentajes de similaridad genética entre las plántulas analizadas nos permiten verificar la existencia de una alta tasa de variación somaclonal. En *Heliconias*, Rodrigues (2008), utilizando caracteres fenotípicos describe variaciones en plantas de *H. bihai* cv. Lobster Claw I, esta tasa de variación somaclonal fue de 61.40% y fue evidenciada con mayor facilidad en las plantas que superaron el subcultivo 18, concluyendo que el límite máximo en el número de pases para esta especie que aseguren uniformidad genética fue excedido.

Los resultados de este trabajo corroboran lo planteado por Vos *et al.*, (1995); Sánchez-Chiang y Jiménez (2009); Bairú *et al.*, (2011) y otros, los cuales coinciden en que la técnica de AFLP es una herramienta muy efectiva para revelar polimorfismos en fragmentos de restricción y detectar fácilmente

variaciones genotípicas de una línea embriogénica a otra. Sin embargo, hay que tener en cuenta ciertos puntos relacionados al patrón de bandas generados por esta técnica y los cambios que estas señalan a nivel genético.

Las plantas propagadas por técnicas *in vitro* pueden estar expuestas a altos niveles de estrés oxidativo dado por las reacciones que se dan con el oxígeno metabolizado, lo anterior puede causar daños en el ADN incluyendo inestabilidad en ciertos puntos. Probablemente dado por estas razones, las variaciones morfológicas se pueden dar durante la micropropagación, aunque muchas de estas pueden tener una reversión a un estado normal cuando las plantas son transferidas al suelo y el estrés al que están sometidas se regule (Lakshmanan *et al.*, 2007). Estos cambios no están estrictamente asociados a cambios genéticos, pero tal vez se relacionan a cambios transitorios en la metilación del ADN que pueden modificarse dependiendo de las condiciones de las plantas (Lakshmanan *et al.*, 2007).

Lo anterior puede sustentar la idea de que aunque fueron registrados cambios en el patrón de bandeo desde subcultivos bajos, este es un fenómeno normal a nivel epigenético producido por el cambio en los sitios de metilación y de otras modificaciones epigenéticas que hacen parte de la morfogénesis *in vitro* (Kaepler *et al.*, 2000), y que a nivel fenotípico, este resultado no quiere decir que la propagación a partir de yema floral o el uso de altas concentraciones iniciales de hormonas sean las directas responsables por si solas de la variación genética evidenciada; y aún mas importante, estos resultados no descartan el uso de las Heliconias micropropagadas con un número controlado de subcultivos para campañas promisorias de cultivo y comercialización.

Marulanda *et al.*, (2011b) evaluaron el desarrollo de Heliconias propagadas de forma similar a las de esta investigación y lo compararon con Heliconias propagadas por métodos convencionales. Las principales diferencias observadas son crecimiento más rápido de las Heliconias provenientes del cultivo *in vitro* con relación a las plantas propagadas por el método convencional. De la misma forma, Rodrigues *et al.*, (2006) haciendo evaluaciones de productividad en campo con material originado por cultivo *in vitro* reportaron con *H. bihai* cv. Lobster Claw I un mayor número de brotes, por ende, una mayor productividad de las plantas clonadas en micropropagación, comparado con plantas originadas por métodos tradicionales. Una mayor altura de las plantas y aumento en el diámetro del pseudotallo es explicado por Sandoval *et al.*, (1991) e Israeli *et al.*, (1991) como un efecto del rejuvenecimiento y saneamiento provocado por el cultivo *in vitro*, siendo esto muy observado en plátanos y bananos. El rejuvenecimiento *in vitro* se

produce al perder el tejido la señal que poseía de la planta madre, esta pérdida es más rápida a medida que el explante sea más pequeño y se den más subcultivos, manifestándose con un aumento en el vigor fisiológico de determinadas variables agronómicas (Israeli *et al.* 1991)

Rodrigues (2008) enuncia la necesidad de un análisis molecular para estudiar la variación somaclonal en Heliconias, lo anterior principalmente impulsado por la utilidad que tiene este fenómeno para la obtención de variabilidad genética en floricultura y ornamentación.

Es importante resaltar que adicional a la evidencias de una expresión de variación somaclonal encontrada en estas plantas, se debe incluir la variación intraespecífica previamente discutida como un elemento que aporta a la diferenciación de individuos a pesar de provenir de una multiplicación clonal. Isaza (2008) discutió este punto en el que mostró que a través de las bandas generadas por los AFLP no encontró un individuo 100% igual a otro.

Por esta parte cabe resaltar que ese tipo de estudios moleculares complementan a la irremplazable evaluación a campo de los caracteres fenotípicos, la cual posibilita la detección y eliminación de plantas fuera de tipo. En este sentido, este tipo de aproximaciones aportan al conocimiento que se ha generado en la micropropagación, biología molecular, prácticas de comercialización y conservación de especies y cultivos en expansión como son las heliconias.

Los resultados dejan en evidencia que para el análisis de individuos de Heliconias, los marcadores AFLP son adecuados para estudios que necesiten hacer una diferenciación entre especies, sin embargo, cuando el análisis requiere una diferenciación intraespecífica, como es el caso de caracterización de cultivares o estabilidad genética donde se reconoce que los clones no son siempre idénticos y el grado de diferencia genética intra-clonal puede variar en las especies (Lasso 2008). Estos marcadores pueden detectar polimorfismos individuales que reflejan la gran variabilidad que hay en este grupo y resulta complicado establecer con un número bajo de individuos.

8. CONCLUSIONES

El análisis de caracterización genética con los AFLPs ayudó a corroborar que los genotipos evaluados pertenecen a las especies *H. ortotricha* y *H. caribaea*, pero no fue posible asociar estas a un cultivar en específico, lo anterior debido a la alta variabilidad intraespecífica que estos genotipos muestran.

Los marcadores AFLPs evaluados en *Heliconia* son una herramienta útil para la diferenciación entre especies, sin embargo, la alta variabilidad genética de los individuos, dificulta un análisis claro a nivel intraespecífico.

Con los AFLP fue posible detectar polimorfismos en los perfiles genéticos de las plántulas propagadas de *H. caribaea* sugiriendo la presencia de variación somaclonal dentro de los clones evaluados.

Varios factores pueden influenciar y promover la variación somaclonal evidenciada con los AFLP en las plántulas de *H. caribaea*, en este caso, una combinación de la influencia del tipo de explante, la concentración hormonal y el número de subcultivos realizados, fueron probablemente los promotores de dicha variación.

El análisis de los datos muestra una mayor diferenciación genética de las plántulas analizadas con un número menor de subcultivos (R2) que aquellas que se encuentran en mayor cantidad de subcultivos (R18), lo anterior se relaciona como un proceso normal dentro de la morfogénesis *in vitro* y los cambios en los patrones de metilación relacionados a la desdiferenciación y rediferenciación de las células del explante.

El uso de los AFLPs para evaluar variación somaclonal permitió encontrar muchas diferencias en el patrón de bandas entre los individuos analizados, sin embargo estas diferencias pueden darse en sitios no activos del genoma, motivo por el cual podrían no ser evidenciadas a nivel fenotípico.

Para Heliconias, la técnica de marcadores moleculares AFLP puede complementarse con otro tipo de marcadores que permitan caracterizar y diferenciar a cada uno de los genotipos intraespecíficos, por lo que esta metodología combinada puede ser utilizada para evaluar la variación somaclonal que pudiera ser inducida por el cultivo *in vitro* en Heliconias y, de esta manera, asegurar la fidelidad genética de las plantas micropropagadas, así como para estudios de diversidad genética y caracterización de genotipos específicos.

9. RECOMENDACIONES

- Se propone el uso de la técnica de marcadores moleculares microsatélites como una alternativa práctica, rápida y efectiva para el estudio de la caracterización genética en materiales de *Heliconia*.
- Para el estudio de la estabilidad genética se puede considerar hacer un análisis con marcadores como los MSPs (*Metylation Specific PCR*) que detectan sitios específicos de metilación en el genoma, así como marcadores microsatélites y comparar estos resultados con los arrojados por este trabajo con AFLPs.
- La detección de posible variación somaclonal en los materiales vegetales, sugiere la realización de estudios posteriores encaminados a evaluar las características agronómicas y de producción de los mismos, además de su posible utilización en un futuro y dependiendo de los resultados, en programas de mejoramiento genético o conservación.
- Tener en cuenta los datos morfológicos de los clones que se encuentren en condiciones de campo, realizar la asociación de los marcadores moleculares y compararlos con los resultados obtenidos en el análisis

10. LITERATURA CITADA

- Andersson, L. 1981. Revision of *Heliconia* sect. *Heliconia* (Musaceae). Nordic J. Bot. 1: 759-784.
- Andersson, L. 1984. The chromosome number of *Heliconia* (Musaceae). Nordic J. Bot. 4: 191-193.
- Andersson, L. 1985. Revision of *Heliconia* subgen. *Stenochlamys* (Musaceae-Heliconioideae). Opera Bot. 82: 1-124.
- Andersson, L. 1992. An evolutionary scenario for the genus *Heliconia* (Heliconiaceae). In: L.B. Holm-Nielsen, I. Nielsen y H. Balslev (eds.), Tropical Forests: Botanical Dynamics, Speciation and Diversity, pp. 185-191. Academic Press, London.
- Aranda, YV.; Bello, A.; Montoya, IA. 2007. Exploración del mercado de heliconias en el segmento de consumo intermedio en las ciudades de Arauca (Colombia) y Acarigua y Caracas (Venezuela). Agronomía Colombiana 25(1), 189-196.
- Bairú MW, Fennell CW, van Staden J. 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). Sci Hortic 108:347-35.
- Bairú MW, Aremu AO, Van Staden J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regul. 63:147-173
- Bassam, B.J. Caetano-Anolles, G Y Gresshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA polyacrylamide gels. Annual. Biochem. 196: 80-83.
- Benbouza H, Jacquemin JM, Baudin JP, Mergeai G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotech Agron Soc Environ. 10: 77-81.
- Berry F. y Kress WJ. 1991. *Heliconia*: An identification guide. Smithsonian Institution Press, Washington and London, 334p.
- Betancur, J. 2005. Familia *Heliconiaceae*. En: Memorias XXV Reunión Asociación Colombiana de Herbarios- ACH. Armenia
- Betancur, J. y W. J. Kress. 2007. La familia *Heliconiaceae* en Colombia. Actualidades Biológicas (supl. 1): 77.

- Bouman, H.; De Klerk, G.J. 1997. Somaclonal variation. In: Geneve, R.L.; Preece, J.E.; Merkle, S.A. Biotechnology of ornamental plants. Wallingford: CABI. p.165 - 183.
- Cardone, C; Olmos, S; Echenique, V. 2004. Variación Somaclonal. In Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. Eds. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Ediciones INTa, Argentina. p. 81-96.
- Castro, C.E.F., C. Gonçalves and A. May. 2007. Atualização da nomenclatura de espécies do gênero *Heliconia* (Heliconiaceae). R. Bras. Hortic. Ornam. Campinas, Brazil. 13: 38–62.
- Cervera, M.T., Cabezas, J.A., Sancha, J.C., Martínez de Toda, F., Martínez-Zapater, J.M. 1998. Application of AFLP to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. Genetic resources. A case study with accessions from La Rioja (Spain). Theor Appl Genet, 97: 51-59.
- Chatterjee, G., Prakash, J. 1996. Genetic stability in commercial tissue culture.-In: Prakash, J., Pierik, R.L.M. (ed.): Plant Biotechnology: Commercial Prospects and Problems. Pp. 111–121. Oxford IBH Publishing Co., New Delhi-Bombay-Calcutta
- Chial, H. 2008. DNA fingerprinting using amplified fragment length polymorphisms (AFLP): No genome sequence required. *Nature Education* 1(1).
- Côrtes, M. C., Gowda, V., Kress, W. J., Bruna, E. M., y Uriarte, M. 2009. Characterization of 10 microsatellite markers for the understory Amazonian herb *Heliconia acuminata*. *Molecular Ecology Resources*, 9(4), 1261-1264.
- Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York.
- Cullis, C. 2007. Somaclonal Variation: Banana as a Model for Identifying Genomic Changes. Department of Biology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA
- De Klerk, G.; Ter Brugger, J.; Bouma, H. 1990. An assay to measure the extent of variation in micropropagated plants of *Begonia x hiemalis* Acta Bot. Neerl. 18: 21-25.
- Devia, W. 1995. Heliconias del Valle del Cauca. Instituto Vallecaucano de Investigaciones Científicas. Cali, Colombia. 129 p.

Díaz, J., L. Ávila y Oyola J. 2002. Sondeo del mercado mundial de Heliconias y Follajes Tropicales. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. 32 pp.

Donini P, Elias L, Bougourd S, Koebner RMD. 1997. AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. *Genome* 40: 521–526.

Douhovnikoff, V. Andr. y S. Dodd. 2003. Intra-clonal variation and a similarity threshold for identification of clones: application to *Salix exigua* using AFLP molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1307- 315.

En Colombia. 2013. Cultivo, Propagación Y Cosecha De Heliconias, Floricultura, Cultivo De Heliconias. Disponible en: http://www.encolombia.com/economia/floriculturandina_heliconias2.htm Fecha de consulta: 01.07.13.

Engelborghs I., R. Swennen, y S. Van Campenhout. 1998. The potential of AFLP to detect genetic differences and somaclonal variants in *Musa* spp. *Infomusa*. 7(2):3-6.

Evans, D. A. and W. R. Sharp. 1988. Somaclonal and gametoclonal variation. En: Evans, D. A.; W. R. Sharp; P. V. Ammirato (eds.), *Handbook of Plant Cell Culture*, vol. 4. Macmillan Publishing Company, New York, pp. 97-132.

Ferreira, M.E. y D. Grattapaglia. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA, Brasília. 220 pp.

Gowda, Vinita, Erickson, David L. and Kress, W. John 2012. Development and characterization of microsatellite loci for two Caribbean Heliconia (Heliconiaceae: *H. bihai* and *H. caribaea*). *American Journal of Botany*, 99(2): e81-e83.

Gupta, PK y Varshney, RK. 1999. Molecular Markers for Genetic Fidelity during Micropropagation and Germplasm Conservation. *Current Science*. 76: 1308–1310.

Haisel D, Hofman P, Vagneri M, Lipavska H, Ticha L, Schafer C, Capkova V. 2001. *Ex vitro* phenotype stability is affected by *in vitro* cultivation. *Biol Plant*. 44: 321-324.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

Hanson, L., McMahon, K.A., Johnson, M.A.T. and Bennett, M.D. 2001. First nuclear DNA C-values for another 25 angiosperm families. *Ann. Bot.* 88: 851-858.

Harirah, A.A. and Khalid, N. 2006. Direct Regeneration and RAPD assessment of male inflorescence derived plants of *Musa acuminata* cv. 'Berangan'. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 14 (1):11 – 17.

Heliconia Society International. 2013. The Order Zingiberales. Disponible en: http://www.heliconia.org/plants_index.html Consultado: 01.07.13

Henao, E. R. y K. A. Ospina. 2008. Insectos benéficos asociados a cultivos de heliconias en el Eje Cafetero colombiano. *Boletín Científico Museo de Historia Natural*, 12:157-166.

Isaza-Valencia L. 2004. Desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* de heliconias. Informe final Joven investigador Colciencias. Universidad Tecnológica de Pereira – Facultad de Ciencias Ambientales – Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Isaza-Valencia L. 2008. Estudio de la diversidad genética y caracterización molecular de algunas especies comerciales del género *Heliconia*. Trabajo de investigación presentado para optar al título de Magíster en Biología Vegetal. Universidad Tecnológica De Pereira, Universidad De Caldas, Universidad Del Quindío. Pereira.

Isaza L., Marulanda M.L y López A.M. 2012. Genetic diversity and molecular characterization of several *Heliconia* species in Colombia. *Genetics and Molecular Research* 11 (4): 4552-4563

Israeli. Y, Reuveni O, Lahav E. 1991. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. *Scientia Horticulturae* 48: 71-88.

Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44, 223–270

Jatoi, S.A., A.Kikuchi, M.Mimura, S.S.Yi and K.N.Watanabe. 2008. Relationship of *Zingiber* species, and genetic variability assessment in ginger (*Zingiber officinale*) accessions from ex-situ genebank, on-farm and rural markets. *Breed. Sci.* 58: 261–270.

Jerez E. 2007. El cultivo de las heliconias. *Cultivos Tropicales*. Vol 28 N° 1 p 29-35.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., y Donoghue, M. J. 2002. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach, Ed. 2. Sinauer, Sunderland, Mass.

Kaeppler, S.M., H.F. Kaeppler and Y. Rhee. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology, 43: 179-188.

Kress, W.J. 1990. The phylogeny and classification of the Zingiberales. Ann. Mo. Bot. Gard. 77:698–721.

Kress, W.J., J. Betancur y B. Echeverry. 1999. Heliconias, Llamaradas de la Selva Colombiana. Guía de Campo. Cristina Uribe Editores Ltda., Primera Edición, Santafé de Bogotá. 200 p.

Kress W. J. L. M. Prince K. J. Williams. 2002. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. American Journal of Botany 89: 1682-1696.

Kress, W.J., Liu, A.-Z., Newman, M., Li, Q.-J., 2005. The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): a complex and polyphyletic genus of gingers. Am. J. Bot. 92 (1), 167–178.

Kress, W.J. and Specht, C.D. 2006. “The evolutionary and biogeographic origin and diversification of the tropical monocot order Zingiberales.” In J. T. Columbus, E. A. Friar, C. W. Hamilton, J. M. Porter, L. M. Prince, and M. G. Simpson, [eds.], Monocots: comparative biology and evolution. Rancho Santa Ana Botanic Garden, Claremont, California.

Kumar, P.P., J.C.K.Yau and C.J.Goh. 1998. Genetic analysis of *Heliconia* species and cultivars with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) makers. J. Ameri. Soc. Hort. Sci. 123: 91–97.

Labra M, Savini C, Bracale M, Pelucchi N, Colombo L, Bardini M, Sala F. 2001. Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep 20: 325-330.

Lagomarsino, L. y Kress, J. 2007. Phylogeny reconstruction and trends of floral evolution in *Heliconia* subgenus *Heliconia* (Heliconiaceae). En:http://www.nmnh.si.edu/rtp/students/2007/virtualposters/poster_2007_lagomarsino.html. Fecha de consulta: Julio 7 de 2013

Lakshmanan, V., S. R. Venkataramareddy and B. Neelwarne. 2007. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shorts of banana using RAPD and ISSR markers. E. J. Biotechnol. 10(1). Disponible en: <http://www.ejbio technology.info/content/vol10issue1/ full/12/>.

Larkin, P.J. y Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation. A novel source of genetic variability from cell cultures for improvement. TAG Theoretical and Applied Genetics, 60: 197 – 214.

Lasso. E. 2008. Technical advances. The importance of setting the right genetic distance threshold for identification of clones using amplified fragment length polymorphism: a case of study with five species in the tropical plant genus *Piper*. Molecular Ecology Resource. 8: 74-82

Leitch I J., Beaulieu J M., Chase M W., Leitch A R., y Fay M F. 2010. Genome Size Dynamics and Evolution in Monocots,” Journal of Botany, vol. Article ID 862516, 18 p.

Linacero R, Alves EF, Vazquez AM. 2001. Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye. Theor Appl Genet 100:506–511.

Loges V, Teixeira MCF, Castro ACR and Costa AS. 2005. Colheita e pós-colheita de flores tropicais no estado de Pernambuco. Revista de Horticultura Brasileira 23: 699-672.

Loges, V., de Castro, C.E.F., Guimarães, W.N.R., Costa, A.S., de A. Lima, T.L. and Leite, K.P. 2012. Agronomic Traits Of *Heliconia* For Cut Flowers Use And Molecular Markers. Acta Hort. (ISHS) 937:535-543. Disponible en: http://www.actahort.org/books/937/937_65.htm.

Londoño-Giraldo L. M. 2010. Desarrollo de protocolos de propagación masiva de *Heliconia bihai* cv. Lobster Salmón, *H. bihai* cv. Halloween y *H. stricta* cv. Iris Red. Informe final Jóvenes Investigadores e Innovadores “Virginia Gutiérrez De Pineda”. Colciencias. Grupo de Investigación en Biodiversidad y Biotecnología. Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Tecnológica de Pereira. Risaralda.

Londoño-Giraldo L. M. 2012. Comparación y seguimiento de protocolos *in vitro* en multiplicación, enraizamiento y aviveramiento de 3 especies de heliconias: *H. bihai* cv. Lobster Salmón, *H. bihai* cv. Halloween, *H. orthotricha* cv. Arco Iris, *H. orthotricha* cv. Filo de la Noche y *H. caribaea* spp. Informe Técnico Final. Programa Jóvenes Investigadores E Innovadores “Virginia Gutiérrez De Pineda”.

Colciencias. Grupo de Investigación en Biodiversidad y Biotecnología. Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Tecnológica de Pereira. Risaralda.

Lu. Y, Zhang X, Pu J, Qi Y, Xie Y. 2011. Molecular assessment of genetic identity and genetic stability in banana cultivars (*Musa* spp.) from China using ISSR markers. AJCS 5(1):25-31. ISSN: 1835-2707.

Mante S. y Tepper H.B. 1983. Propagation of *Musa textilis* Née Plants from Apical Meristem Slices *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 2(2): 151-159.

Marouelli, L. P. 2009. Análise filogenética de acessos do gênero *Heliconia* L. (Heliconiaceae) utilizando marcadores moleculares. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, DF. Orientador: Glaucia Salles Cortopassi Buso, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 88 p

Marouelli, L.P., P.W. Inglis, M.A. Ferreira and G.S.C. Buso. 2010. Genetic relationships among *Heliconia* (Heliconiaceae) species based on RAPD markers. Genet. Mol. Res. 9: 1377–1387.

Martinez, O.; Reyes, L. M.; Beltran, M. 1998. Chemovariability in the genus *Musa*: similarities and differences. Infomusa 7(2):16–20

Martínez G., Delgado E., Pargas R., Manzanilla E., Ramírez H. 2007. Consideraciones generales sobre la producción y el comercio mundial de banano. I: producción, exportación e importación. Revista Digital CENIAP Hoy No. 13. <http://ceniap.gov.ve/pbd/revistastecnicas/ceniaphoy/index.htm>. Fecha de consulta: 4/07/2013.

Marulanda M. L. y Isaza L. 2004. Establecimiento In Vitro de Heliconias Con Fines De Producción Masiva. Scientia et Technica Año X, No 26.

Marulanda Ángel ML, Isaza-Valencia L, y Londoño-Giraldo L M. 2011. Propagación *in vitro* de *Heliconia bihai* (L.) cv. Lobster Salmón. Acta Agronómica. 60 (2), p 132-139.

Marulanda Ángel ML, Isaza-Valencia L, Duque Nivia A. A. y Londoño-Giraldo L M. 2011b. Biodiversidad y biotecnología en la evaluación de cultivares comerciales de Heliconias. Libro resultado de investigaciones. Universidad Tecnológica de Pereira. Publiprint Ltda. 125p.

Matos, J., Coelho, P. Ferreira, M., Pedroza, Z., Torres, A., Ceolin, J., Salles, G. 2004. Estudo da variabilidade genética entre indivíduos de populações de

Heliconia bihai e *Heliconia rostrata*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. 15 pp.

Medina C., García I., Caro M., Aristizábal F.A. 2007. Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. Vol. 36 (1), 70-80.

Meléndez-Ackerman EJ, Speranza P, Kress WJ, Rohena L, Toledo E, Cortés C, Treece D, Gitzendanner M, Soltis P, Soltis D. 2005. Microevolutionary processes inferred from AFLP and morphological variation in *Heliconia bihai* (Heliconiaceae). Int J Plant Sci 166:781–794.

Meudt HM, Clarke AC. 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci.* 12 (3): 106–17.

MOBOT. 2013. Missouri Botanical Garden. Angiosperm Phylogeny Website, Version 12. Disponible En: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> Consultado: 01.07.13

Mueller, U. G., y Wolfenbarger, L. L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. Trends in Ecology and Evolution. 14, 389–394.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497

NACIONES UNIDAS. 2006. Biotrade Initiative. Diagnóstico de la cadena productiva de flores y follajes en los departamentos del Eje Cafetero y Valle del Cauca (Colombia). Edición: José Andrés Díaz M.

Nadal-Medina R, Manzo-Sánchez G, Orozco-Romero J, Orozco-Santos M, Guzmán-González S. 2009. Diversidad genética de bananos y plátanos (*Musa* spp.) Determinada mediante marcadores RAPD. *Revista Fitotecnia Mexicana*, Vol. 32, Núm. 1, enero-marzo, 2009, pp. 1-7 Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. México.

Newbury, H. J.; Howell, E. C.; Crouch, J. H.; Ford-Lloyd, B. V. 2000. Natural and cultural induced variation in plantains (*Musa* spp. AAB group). *Aust. J. Bot.* 48:493–500.

Noyer JL, Causse S, Tomekpe K, Bouet A, Baurens FC. 2005. A new image of plantain diversity assessed by SSR, AFLP and MSAP markers. *Genetica*; 124:61-69.

- Pejic, I.; Ajmone-Marsan, P.; Morgante, M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1248-1255.
- Peteira, B; Finalet, J.A; Fernández, E; Sánchez, I; Miranda, I. 2003. Caracterización de la variabilidad genética en *Musa* spp. con la utilización de marcadores RAPD. *Revista de Protección Vegetal* 18: 112–118.
- Pierik, R. L. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa, p. 301.
- Pinzón, Y.D. 2010. El cultivo de las heliconias y las flores tropicales, nueva opción de exportación. <http://heliconias.galeon.com/>. Fecha de consulta: 15 de agosto de 2010.
- Polanco, C. y Ruiz, M. L. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Plant Science*. 162: 817–824.
- Prem J, Kizhakkayil J, Thomas E, Dhanya K, Syamkumar S y Sasikumar B. 2008. Characterization Molecular of primitive, elite and exotic ginger genotypes to protect the biowealth of elite ginger accessions. *Journal of Spices and Aromatic Crops*. Volume 17 (2): 85-90.
- Ramos Guimarães W. Nogueira, G de Moraes Guerra Ferraz, L S Semen Martins, L. Vilela Resende, H. Almeida Burity y V. Loges. 2012. Genetic Diversity Analysis of *Heliconia psittacorum* Cultivars and Interspecific Hybrids Using Nuclear and Chloroplast DNA Regions, *Agricultural Science*, Dr. Godwin Aflakpui (Ed.), ISBN: 978-953-51-0567-1, InTech, DOI: 10.5772/48815. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/agricultural-science/genetic-diversity-analysis-of-heliconia-psittacorum-cultivars-and-interspecific-hybrids-using-nuclea>
- Ray T, Dutta I, Saha P, Das S y. Roy S.C. 2006. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (2006) 85: 11–21.
- Rodrigues PHV, Tulmann Neto A, Cassieri Neto P, Mendes BMJ. 1998. Influence of the number of subcultures on somaclonal variation in micropropagated Nanico (*Musa* spp., AAA group). *Acta Horti* 490:469–473.

- Rodrigues, PHV. 2005. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). Sci. agric. (Piracicaba, Braz.), Piracicaba, v. 62, n. 1, Jan. 2005.
- Rodrigues, PHV.; Ambrosano, G. M. B.; Lima, A. M. L. P.; Mendes, B. M. J.; Rodriguez, A. P. M. 2006. *Heliconia bihai* var. Lobster Claw I: cut-flower field production from micropropagated versus rhizome-derived plants. En Teixeira da Silva, J.A. (ed.): Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues. Volumes I-IV. - Global Science Books, London. 2532 pp
- Rodrigues, PHV. 2008. Somaclonal variation in micropropagated *Heliconia bihai* cv. Lobster Claw I plantlets (Heliconiaceae). Sci. agric. (Piracicaba, Braz.), Piracicaba, v. 65, n. 6, Dec.
- Sanchez-Chiang, N. y V. Jiménez. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. Agronomía Mesoamericana 20(1): 135-151.
- Sahijram, L., Soneji, J.R. and Bollamma, K.T. 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). In vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 39: 551 – 556.
- Sandoval, J, Tapia A, Müller L, Villalobos V. 1991. Observaciones sobre la variabilidad encontrada en plantas micropropagadas de *Musa* cv. 'Falso Cuerno' AAB. Fruits 46 (5): 533-539.
- Sheela, L., Geetha, P., Jayachandran, C. y Rajmohan, K. 2006. Molecular characterization of *Heliconia* by RAPD assay. Journal of Tropical Agriculture 44: 37-41.
- Shirani Bidabadi, S., Meon, S., Wahab, Z., Mahmood, M. 2010. Study of Genetic and Phenotypic Variability among Somaclones Induced by BAP and TDZ in Micropropagated Shoot Tips of Banana (*Musa* spp.) Using RAPD Markers. Journal of Agricultural Science, North America, 2, aug.
- Silva A, Trujillo I, Vidal M y Pérez V. 2009. Evaluación de la inducción de variabilidad genética en Cambur 'Manzano' (*Musa* AAB) a través de Marcadores RAPD. Agronomía Trop. 59(4): 413-422.
- Smith MK. 1988. A review of factors influencing the genetic stability of micropropagated bananas. Fruit 43: 219-223.
- Sosa-Rodriguez, F M. 2013. Cultivo del género *Heliconia*. Cultrop [online]. vol.34, n.1. pp. 24-32.

Thangam, M., M.S.Ladaniya, S.A.Safeena and S. Priya Devi. 2010. Morphological and molecular diversity of *Heliconia* species-a potential exotic ornamental plant. Pp: 43. En Memorias: Third National Congress on Plant Breeding and Genomics. 7-9 de Julio de 2010. India.

Ude, G., Pillay, M., Nwakanma, D. y Tenkouano, A. 2003. Genetic Diversity in *Musa* Systematic Colla and *Musa balbisiana* Colla and some of their natural hybrids using AFLP Markers. Theoretical and Applied Genetics 104:1246- 1252.

Valadez-Moctezuma, E.; Kahl. G.; Ramser, J.; Hüttel, B.; Rubluo-Islas, A. 2001. Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. Rev. Fitotec. Méx. 24(1): 103-120p.

Vendrame, W.A. G. Kochert y H.Y. Wetzstein. 1999. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos, *Plant Cell Reports*, 18, 853

Vos, P.; R. Hogers; M. Bleeker; M. Reijans; T. V. Lee; M. Hornes; A. Frijters; J. Pot; J. Peleman; M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res. 23: 4407-4414.

Vuylsteke D, Swennen R y De Langhe E. 1991. Somaclonal variation in plaintains (*Musa* spp, AAB group) derived from shoot-tip culture. *Fruits* 46: 429-439.

Vuylsteke M, Peleman JD, van Eijk MJ. 2007. AFLP technology for DNA fingerprinting. *Nat Protoc* 2:1387–1398

Wahyuni S, Xu D H, Bermawie N, Tsunematsu H y Ban T. 2003. Genetic relationships among ginger accessions based on AFLP marker. *Journal Bioteknologi Pertanian*. 8: 60-68.

Weising K, Nybom N, Wolff K, Meyer W. 1995. DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. Boca Raton, FL: CRC Press.

Williams, K. J., Kress, J. W., Manos, P. S. 2004. The phylogeny, evolution and classification of the genus *Globba* and the tribe Globbeae (Zingiberaceae): Appendages do Matter. *Amer. J. Bot* 91: pp. 100-114.

ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo de Extracción de ADN para Heliconias

1. Precalentar el buffer CTAB a 60°C y pesar 0,5 g de tejido, adicionar 5 ml de buffer CTAB y 1ml de PVP 2%
2. Mezclar en vortex y llevar a baño María 30min, 60°C
3. Se ponen las muestras en hielo, se agrega 1 volumen de Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcla por inmersión y se centrifuga a 15.000 rpm por 10 min.
4. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se agrega 1 volumen de Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcla por inmersión y se centrifuga a 15000rpm por 10 min.
5. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se adiciona 0,1 volumen de acetato de sodio 3M e isopropanol 2/3.
6. Se deja precipitar toda la noche, a -20°C.
7. Se centrifuga a 10.000 rpm por 10 min y se descarta el sobrenadante.
8. Se lava con etanol 70° (1ml), se centrifuga a 10.000rpm por 5 min.
9. Se descarta y se deja secar el pellet sobre toallas absorbentes.
10. Se resuspende en 60 µl de TE, se trata con 2µl de ARNasa.
11. Se incuba a 37°C por 30min y se almacena a -20°C

ANEXO 2

Protocolo de extracción del Laboratorio de Genética Molecular CIAT (adaptado para Yuca)

1. Macerar el tejido hasta obtener un polvo fino con Nitrógeno líquido
2. Agregar 480 µl de buffer precalentado a 74°C
3. Mezclar bien
4. Incubar a 74°C, durante 30 minutos (agitar cada 5 minutos)
5. Enfriar a temperatura ambiente.
6. Agregar 480µl de Fenol: Cloroformo : Alcohol Isoamilico (25:24:1)
7. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos
8. Recuperar sobrenadante
9. Agregar un volumen de Cloroformo: Alcohol Isoamilico (24:1)
10. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos
11. Recuperar sobrenadante
12. Agregar 270 µl de Isopropanol
13. Agitar por inversión y dejar en nevera a -20°C durante mínimo 1 hora
14. Centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos
15. Descartar el sobrenadante, no botar el pellet
16. Agregar 100µl de etanol 70% (frio)
17. Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos
18. Descartar el sobrenadante, ojo con los pellets (repetir este paso)
19. Secar los pellets en el speed-vac hasta eliminar todo el etanol
20. Agregar 50 µl de TE + RNasa (1µl por 50µl de TE)
21. Incubar durante 30 minutos a 37°C.
22. Ver 2µl de ADN en un gel de agarosa a 0.8%
23. Cuantificar

Buffer de extracción para 100ml

Tris: 100mM pH: 8

NaCl: 1,4M

EDTA 20mM

PEG (polyethienyl-glycol): 1% P/V

MATAB: 2% P/V

Bisulfito de sodio: 0,5% P/V

ANEXO 3

Matriz de Similaridad Genética para los individuos estudiados en la estabilidad genética de *H. caribaea*

	H. c 1 (Madre)	H. c R15	H. c R2	H. c R18	<i>Musa</i> sp.	<i>Ginger</i> sp.
H. c 1 (Madre)	1	0,42424	0,3125	0,19355	0,12121	0,18182
H. c R15	0,42424	1	0,5	0,375	0,29412	0,26316
H. c R2	0,3125	0,5	1	0,54545	0,30769	0,1875
H. c R18	0,19355	0,375	0,54545	1	0,33333	0,076923
<i>Musa</i> sp.	0,12121	0,29412	0,30769	0,33333	1	0,4
<i>Ginger</i> sp.	0,18182	0,26316	0,1875	0,076923	0,4	1

ANEXO 4

Matriz de Similitud Genética para los individuos estudiados en la caracterización genética de *H. caribaea* y *H. orthotricha*

	H.o 1	H.o 2	H.o Tricolor	H.o Roja	H.o Filo de la Noche	H.o Arco Iris	H.o She (Madre)	H.c 1 (Madre)	H.c Gold	H.c Barbados	H.c Chartreuse	H.c Salomón	H.c Vulcano	H.c Príncipe	H.c Scarlata	H.c Purpurea	H.c Brazilian	H. c RLB	Musa sp.	Ginger sp.
H.o 1	1	0,53571	1	0,35714	0,57692	0,42857	0,5	0,34615	0,2963	0,26923	0,22581	0,15385	0,21429	0,19231	0,18519	0,33333	0,24	0,17391	0,08	0,16
H.o 2	0,53571	1	0,35714	1	0,68182	0,58522	0,34615	0,24	0,47619	0,38095	0,30769	0,3	0,28	0,36364	0,35	0,27773	0,33333	0,22727	0,21053	0,15
H.o Tricolor	0,625	0,35714	1	0,68182	0,58522	0,34615	0,24	0,47619	0,38095	0,30769	0,3	0,28	0,36364	0,35	0,27773	0,33333	0,22727	0,21053	0,15	0,19048
H.o Roja	0,61538	0,57692	0,68182	1	0,5	0,46154	0,25926	0,16667	0,28	0,32143	0,26087	0,2963	0,375	0,25	0,24	0,39286	0,30435	0,2381	0,13043	0,21739
H.o Filo de la Noche	0,57692	0,42857	0,58522	0,5	1	0,37037	0,32	0,32	0,29167	0,2	0,27273	0,17241	0,28	0,26087	0,25	0,22581	0,26087	0,19048	0,13636	0,22727
H.o Arco Iris	0,42857	0,5	0,34615	0,46154	0,37037	1	0,45455	0,28	0,25	0,2963	0,28571	0,26923	0,24	0,4	0,26087	0,37037	0,33333	0,2	0,2	0,2381
H.o She	0,28571	0,34615	0,24	0,25926	0,32	0,45455	1	0,4	0,3	0,24	0,21053	0,20833	0,22727	0,26316	0,19048	0,26923	0,33333	0,25	0,11111	0,1
H.c 1 (Madre)	0,44	0,2963	0,47619	0,41667	0,32	0,28	0,4	1	0,44444	0,40909	0,27778	0,38095	0,35	0,33333	0,25	0,5	0,33333	0,33333	0,17647	0,15789
H.c Gold	0,36	0,26923	0,38095	0,28	0,29167	0,25	0,3	0,44444	1	0,38095	0,4	0,5	0,47059	0,375	0,4375	0,34783	0,22222	0,2	0,28571	0,17647
H.c Barbados	0,3	0,22581	0,30769	0,32143	0,2	0,2963	0,24	0,40909	0,38095	1	0,36842	0,68421	0,36364	0,5	0,27273	0,56522	0,35	0,27778	0,27778	0,13636
H.c Chartreuse	0,39167	0,15385	0,3	0,26087	0,27273	0,2871	0,21053	0,27778	0,4	0,36842	1	0,26316	0,57143	0,58333	0,42857	0,27273	0,46154	0,36364	0,5	0,30769
H.c Salomón	0,33333	0,24138	0,28	0,2963	0,17241	0,26923	0,20833	0,38095	0,5	0,68421	0,26316	1	0,33333	0,38889	0,36842	0,61905	0,19048	0,16667	0,16667	0,095238
H.c Vulcano	0,25	0,21429	0,36364	0,375	0,28	0,24	0,22727	0,35	0,47059	0,36364	0,57143	0,33333	1	0,35294	0,41176	0,33333	0,35294	0,26667	0,26667	0,3125
H.c Príncipe	0,33333	0,19231	0,35	0,25	0,26087	0,4	0,26316	0,33333	0,375	0,5	0,58333	0,38889	0,35294	1	0,3125	0,38095	0,42857	0,33333	0,33333	0,2
H.c Scarlata	0,22222	0,18519	0,27273	0,24	0,25	0,26087	0,19048	0,25	0,4375	0,27273	0,42857	0,36842	0,41176	0,3125	1	0,42857	0,23529	0,21429	0,30769	0,35714
H.c Purpurea	0,36667	0,33333	0,33333	0,39286	0,22581	0,37037	0,26923	0,5	0,34783	0,56522	0,27273	0,61905	0,33333	0,38095	0,42857	1	0,26087	0,19048	0,19048	0,28571
H.c Brazilian	0,28	0,24	0,22727	0,30435	0,26087	0,33333	0,33333	0,22222	0,35	0,46154	0,19048	0,35294	0,35294	0,42857	0,35294	0,26087	1	0,6	0,33333	0,2
H. c RLB	0,21739	0,17391	0,21053	0,2381	0,19048	0,2	0,25	0,33333	0,2	0,27778	0,36364	0,16667	0,26667	0,33333	0,21429	0,19048	0,6	1	0,33333	0,076923
Musa sp.	0,16667	0,08	0,15	0,13043	0,13636	0,2	0,11111	0,17647	0,28571	0,27778	0,5	0,16667	0,26667	0,33333	0,30769	0,19048	0,33333	1	0,4	0,4
Ginger sp.	0,2	0,16	0,19048	0,21739	0,22727	0,2381	0,1	0,15789	0,17647	0,13636	0,30769	0,095238	0,3125	0,2	0,35714	0,28571	0,2	0,076923	0,4	1

ANEXO 5

Registro Fotográfico.

Fotografías por Andrés Duque N.



H. orthotricha cv. Filo de la noche



H. orthotricha cv. Tricolor



H. orthotricha cv. Arco Iris



H. orthotricha cv. She



H. orthotricha cv. Roja



H. caribaea cv. Scarlata



H. caribaea cv. Barbados



H. caribaea cv. Brazilian Bomber



H. caribaea cv. Chartreuse



H. caribaea cv. Vulcano



H. caribaea cv. Purpúrea



H. caribaea cv. Príncipe de la Oscuridad



H. caribaea cv. Salmón



H. caribaea cv. Gold